

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Botanika



Bc. Lenka Machová

Faktory virulence komplexu *Trichophyton benhamiae*

*Virulence factors of the *Trichophyton benhamiae* complex*

Diplomová práce

Školitel: Mgr. Adéla Čmoková

Praha 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci vypracovala samostatně až na bioinformatickou analýzu dat ze sekvenace RNA, kterou provedl Mgr. Martin Kostovčík. Prohlašuji, že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a citovanou literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 10. 8. 2020

.....

Lenka Machová

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svojí školitelce Mgr. Adéle Čmokové za podporu a trpělivost při vedení této diplomové práce. Velký dík patří lidem, kteří umožnili provedení pokusů s myšími kožními explantáty, konkrétně Kláře Kostovčíkové, Ph.D. z Laboratoře buněčné a molekulární imunologie MBÚ AV ČR a Miladě Šírové, Ph.D. a Bc. Filipu Vomáčkovi z Laboratoře nádorové imunologie MBÚ AV ČR za poskytnutí kontrolních a vyřazených myší a dále Mgr. Barboře Tomalové za jejich usmrcení.

Děkuji také všem, kdo mi pomáhali osvojit si nové metody. Děkuji Mgr. Vojtěchu Tláškalovi za rady s přípravou mRNA knihoven, Jiřímu Dvořákovi, Ph.D. za rady s metodou RT-qPCR a Jaroslavu Semerádovi, Ph.D. za pomoc a rady s GC-MS analýzou. Mnohokrát děkuji i všem lidem z kryptogamologického oddělení Katedry botaniky PřF UK za přátelskou atmosféru a cennou zpětnou vazbu.

Největší díky patří mé rodině a kamarádům, včetně všech lidí z Laboratoře genetiky a metabolismu hub MBÚ AV ČR. Bez vás by tato diplomová práce nikdy nevznikla.

Abstrakt:

Dermatofyty jsou skupina hub, z nichž některé mohou díky své schopnosti rozkládat keratinizovanou tkáň způsobovat onemocnění kůže u lidí i zvířat. Mezi zástupce této skupiny patří také kmeny komplexu *Trichophyton benhamiae*, známí původci dermatofytóz zejména drobných hlodavců a králíků. V poslední dekádě se jedna ze čtyř populací tohoto komplexu epidemicky šíří Evropou mezi morčaty a jejich chovateli. Aby mohla být zodpovězena otázka, co stojí za úspěšným šířením této populace, byla zkoumána genová exprese a produkce volatilních organických látek epidemické a neepidemických populací *T. benhamiae*. Genová exprese tří kmenů od každé populace byla studována při růstu v tekutém médiu a na *ex vivo* myších kožních modelech připravených podle nově optimalizovaného protokolu. Pro analýzu genové exprese byly zvoleny metody RNAseq a RT-qPCR. Na základě literatury a výsledků předběžné analýzy RNAseq bylo vybráno několik genů, pro které byly navrženy specifické primery. Spektra produkovaných volatilních organických látek stejných kmenů rostoucích na ovčí vlně ve vialkách byla analyzována metodou GC-MS. Zatímco neepidemické populace se v genové expresi a produkci volatilních organických látek nelišily, epidemická populace se ukázala být odlišná od ostatních zástupců studovaných skupin. Podle získaných dat epidemičtí zástupci zřejmě lépe odolávají stresu a investují více energie do sekundárního metabolismu spíše než do metabolismu primárního. Tato práce zároveň poukazuje na několik nových potenciálních faktorů virulence, např. na katalázu EasC, protein s fasciclinovou doménou a na volatilní látky s vysokým bioaktivním potenciálem, které mohou být uplatněny mimo jiné pro identifikaci epidemické populace v klinické praxi.

Klíčová slova: dermatofyty, *Trichophyton benhamiae*, faktory virulence, genová exprese, volatilní organické látky

Abstract:

Dermatophytes are a group of fungi, some of which can cause skin diseases in humans and animals due to their ability to degrade keratinized tissue. Representatives of this group also include strains from the *Trichophyton benhamiae* complex, known to cause dermatophytosis especially of small rodents and rabbits. In the last decade, one of four populations of this complex has spread epidemically across Europe among guinea pigs and their breeders. To answer the question what stands behind the successful spread of this population, the gene expression and production of volatile organic compounds of epidemic and non-epidemic populations of *T. benhamiae* was investigated. Gene expression of three strains from each population was studied during growth in liquid medium and on *ex vivo* mouse skin models prepared according to a newly optimized protocol. RNAseq and RT-qPCR methods were chosen for the gene expression analysis. Based on the literature and the results of RNAseq preliminary analysis, several genes were selected for which specific primers were designed. The spectra of the produced volatile organic compounds of the same strains growing on sheep wool in vials were analyzed by GC-MS. While non-epidemic populations did not differ in gene expression and production of volatile organic compounds, the epidemic population turned out to be different from the other studied representatives. According to the obtained data, epidemic representatives probably resist stress better and invest more energy in secondary metabolism rather than in primary metabolism. This work also points to several new potential virulence factors, such as catalase EasC, fascicline domain protein and volatile organic substances with high bioactive potential, which can be used, among other purposes, for identification of epidemic population in clinical practice.

Key words: dermatophytes, *Trichophyton benhamiae*, virulence factors, gene expression, volatile organic compounds

Obsah:

1.	ÚVOD	8
2.	LITERÁRNÍ PŘEHLED	9
2.1.	Dermatofyty – původci kožních onemocnění.....	9
2.2.	Faktory virulence dermatofytů	12
2.3.	Sekundární metabolity jako nástroje v taxonomii a diagnostice	14
2.4.	Studium transkriptomu dermatofytů.....	15
2.5.	Využití kožních modelů při studiu dermatofytů.....	17
2.6.	Epidemiologie komplexu <i>Trichophyton benhamiae</i>	18
3.	METODY	20
3.1.	Vybrané kmeny.....	20
3.2.	Analýza genové exprese	21
3.2.1.	Kultivace v tekutém médiu	21
3.2.2.	Kultivace na myší kožní tkáni	21
3.2.3.	Extrakce a zpracování RNA	23
3.2.4.	RNAseq	26
3.2.5.	RT-qPCR.....	27
3.3.	Volatilní metabolity	32
3.3.1.	Kultivace	32
3.3.2.	GC-MS	32
4.	VÝSLEDKY	34
4.1.	Myší kožní modely	34
4.2.	Izolace a zpracování RNA	35
4.3.	RNAseq	36
4.4.	RT-qPCR analýza	38
4.4.1.	Stabilita referenčních genů	38
4.4.2.	Relativní genová exprese	39
4.5.	Volatilní metabolity	46
5.	DISKUZE	48
5.1.	Genová exprese.....	48
5.1.1.	Myší kožní modely versus standardní kultivace	48
5.1.2.	Analýza genové exprese	49
5.1.3.	Geny spojené s proteolýzou	50

5.1.4.	Geny spojené s metabolismem	50
5.1.5.	Geny spojené s adherencí	51
5.1.6.	Geny spojené s odoláváním stresu	52
5.1.7.	Geny spojené s produkcí sekundárních metabolitů	54
5.2.	Volatilní organické látky	55
5.2.1.	Optimalizace kultivace pro GC-MS analýzu	55
5.2.2.	Analýza volatilních organických látek	56
6.	ZÁVĚR.....	58
	Zdroje	60
	Přílohy:	73

Seznam použitých zkratek:

ADP – adenosindifosfát

ATP – adenosintrifosfát

AV ČR – Akademie věd České republiky

cDNA – komplementární DNA

Ct – prahový cyklus (threshold cycle value)

DNA – deoxyribonukleová kyselina

DPP – dipeptidyl peptidáza

FAD – flavinadenindinukleotid

Fdp – protein s fasciclinovou doménou

GC-MS – plynová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií (gas chromatography – mass spectrometry)

Lap – leucinová aminopeptidáza

MALDI TOF MS – Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry)

MCPA – metalokarboxypeptidáza A

Mep – metaloproteáza

NADP – nikotinamidadenindinukleotidfosfát

PCR – polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)

RNA – ribonukleová kyselina

RNAseq – sekvenace RNA

RT-qPCR – kvantitativní řetězová reakce (real time quantitative polymerase chain reaction)

Sub – subtilisin

1. ÚVOD

Druh *Trichophyton benhamiae* (syn. *Arthroderma benhamiae*) je jedním ze zástupců skupiny dermatofytů, tedy vláknitých mikroskopických hub z čeledi *Arthrodermataceae* (řád *Onygenales*) schopných způsobovat kožní onemocnění lidí i zvířat. Mechanismy patogeneze této skupiny jsou však jen málo objasněny a popsáno bylo jen několik málo faktorů virulence, tedy molekul a mechanismů umožňujících patogenu úspěšně napadat hostitele. Problematické je zejména navození podmínek blízkých se přirozeným podmínkám během infekce. Běžná agarová média tyto podmínky dostatečně nenapodobují, pokusy *in vivo* na živých laboratorních zvířatech zase komplikuje hostitelská specifita některých druhů, vysoké finanční náklady a etické otázky. Proto v oblasti studia dermatofytů vznikají stále častěji *ex vivo* kožní modely představující kompromis mezi kultivací na agarových a tekutých médiích a pokusy na živých zvířatech. Dalším problémem, který znesnadňuje studium dermatofyt jsou nevyjasněné hranice mezi jednotlivými taxony. Druh *T. benhamiae* prošel v nedávné době obsáhlou taxonomickou revizí, jednotlivé taxony jsou tak dobře charakterizované. Navíc se zde setkáváme s unikátní situací, kdy se jedna populace šíří mezi hostiteli úspěšněji než ostatní blízké příbuzné taxony. Porovnání taxonů s různou mírou virulence by tedy mohlo poukázat na faktory potenciálně důležité pro schopnost účinně napadat hostitele. Jedním z možných přístupů je srovnání na úrovni genové exprese. Pro účely studia transkribovaných genů je metoda sekvenace RNA (RNAseq) efektivní, avšak finančně nákladnou metodou vhodnou pouze k porovnání malého množství vzorků. Umožňuje však vytipovat potenciálně zajímavé geny. Spojením s kvantitativní PCR na reverzně transkribovaných úsecích (RT-qPCR) lze získat informace o míře exprese takových genů u mnohem širšího souboru studovaných kmenů. Kromě úrovně genové exprese je možné studovat také produkty sekundárního metabolismu. Těmi mohou být i látky s bioaktivními účinky, a tudíž s velkým potenciálním významem pro virulenci. Mezi sekundární metabolity se řadí i volatilní organické látky (tzv. volatily). Druhovú specificitu, snadná detekce na plynovém chromatografu spojeném s hmotnostním spektrometrem (GC-MS) a následná identifikace při srovnání se standardem z nich navíc činí vhodný potenciální diagnostický nástroj pro klinickou praxi. Výsledky zmíněných analýz mohou přispět nejen k identifikaci potenciálních faktorů virulence uvnitř komplexu *T. benhamiae*, ale i k poznání faktorů virulence dermatofytů a patogenních hub obecně.

Cíle práce:

- Připravit *ex vivo* kožní model pro studium *T. benhamiae*.
- Metodami RNAseq a RT-qPCR na základě diferenciální genové exprese epidemických a neepidemických zástupců identifikovat potenciální faktory virulence.
- Ze spekter volatilních metabolitů zástupců *T. benhamiae* vytypovat látky specifické pro jednotlivé populace.
- Ověřit, zda výsledky použitých analýz odpovídají fylogenetickému rozdělení studovaných kmenů.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1. Dermatofyty – původci kožních onemocnění

Dermatofyty jsou skupina blízce příbuzných druhů hub specializovaných na získávání živin ze složek pokožky a kožních derivátů. Většina zástupců rozkládá tento živočišný materiál zahrnující kožní šupinky, chlupy, peří apod. v půdě a pouze příležitostně napadá obratlovce (Summerbell, 2000). Méně početná skupina dermatofytů se pak na obratlovce (nejčastěji savce) přímo specializuje a zahrnuje i zástupce způsobující kožní onemocnění, tzv. dermatofytózy u lidí (Georg, 1960; Weitzman and Summerbell, 1995). Jsou to dokonce nejčastější původci mykotických onemocnění kůže, prevalence dermatofytóz se v celosvětové lidské populaci pohybuje kolem 20–25 % (Havlickova et al., 2008). Projevy tohoto onemocnění jsou variabilní a ovlivněné faktory jako jsou druh patogenu, celková imunita a věk hostitele, druh hostitele, popř. životní styl a mnoho dalších (Degreef, 2008; P. Nenoff et al., 2014b). Nejtypičtějším projevem onemocnění je vznik kruhových, ostře ohraničených zarudlých lézí doprovázených hyperkeratózou, pro které je v anglické literatuře toto onemocnění označováno termínem „ringworm“. V ochlupených částech těla může být onemocnění doprovázeno vypadáváním chlupů a v případě onychomykózy, mykotického onemocnění nehtových plotének, dochází ke zbytnění, diskoloraci a deformaci nehtů či drápů (Degreef, 2008; Moretti et al., 2013; Nenoff et al., 2014b). Příklady projevů dermatofytóz způsobených zástupci *T. benhamiae* lze vidět na obrázku číslo 1. Průběh onemocnění je v drtivé většině případů u lidí i zvířat mírný a hostitele neohrožuje na životě. Imunitní systém savců je dobře nastaven na včasné odhalení a likvidaci houbových patogenů a při běžném průběhu infekce dermatofyty

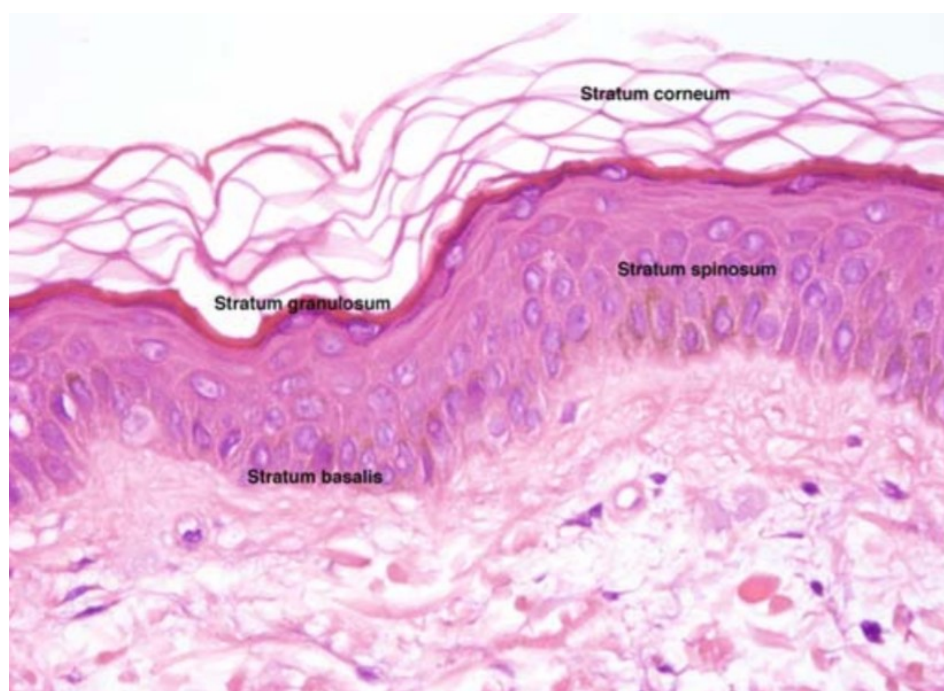
u imunokompetentních pacientů napadají pouze nejsvrchnější vrstvu epidermis – *stratum corneum*, tedy vrstvu s rychlým obratem epidermálních buněk, bohatou na keratin (obrázek číslo 2) (Dahl, 1994; Shoham and Levitz, 2005). Možnou komplikací je imunokompromitace pacientů, kdy například při mutaci v genu CARD9 může infekce u lidí diseminovat do lymfatických uzlin a v ojedinělých případech skončit až smrtí (Lanternier et al., 2013; Nir-Paz et al., 2003; Tejasvi et al., 2005).

Mění se životní styl lidí i zvířat, obzvláště v rozvinutějších částech světa má za následek měnící se profil druhového složení dermatofytů, kdy dříve častější původci ustupují do pozadí a jsou nahrazováni jinými do té doby spíše vzácnějšími druhy (Seebacher et al., 2008; Zhan and Liu, 2017). Například se skotem asociovaný druh *Trichophyton verrucosum* je hlavně díky vakcinaci zvířat, ale i industrializaci chovů a zlepšování hygienických podmínek na ústupu u zvířat i jejich chovatelů (Lund et al., 2014; Seebacher et al., 2008). Naopak na vzestupu jsou do nedávné doby spíše vzácně se vyskytující druhy, jimiž vyvolané infekce se často vyskytují u chovatelů domácích mazlíčků, a to nejčastěji u dětí a adolescentů (Zhan and Liu, 2017). Jako příklad lze uvést zoofilní druh *Trichophyton erinacei*, častý patogen ježků. Se vzrůstající oblibou těchto zvířat jakožto domácích mazlíčků v posledních deseti letech je možné sledovat i nárůst zdokumentovaných případů dermatofytóz jejich chovatelů (Abarca et al., 2017; Kromer et al., 2018; Lysková et al., 2018; Nenoff et al., 2014). Asi nejvýznamnějším zoofilním dermatofytem šířícím se mezi domácími mazlíčky a jejich chovateli je druh *Trichophyton benhamiae*, který stojí za epidemií kožních onemocnění morčat i dětí napříč Evropou (Hubka et al., 2018; Nenoff et al., 2014; Sabou et al., 2018; Skořepová et al., 2014).

Jedním z důvodů úspěšného přenosu tohoto druhu z morčat na lidi může být absence příznaků nákazy u primárních hostitelů, přítomnost patogenu je stejně jako u dalších zoofilních druhů odhalena až při mykologickém screeningu zvířat, nebo častěji při nákaze člověka, u kterého naopak vzniká výrazně se projevující onemocnění (Ates et al., 2008; Ilkit and Demirhindi, 2008; Pomeranz et al., 1999; Romano et al., 1997). Asymptomatická nákaza byla několikrát popsána u druhu *Microsporum canis*, původce kočičích dermatofytóz, a to především u volně žijících zvířat (Mignon and Losson, 1997; Pomeranz et al., 1999; Romano et al., 1997), i u druhu *T. erinacei* (Abarca et al., 2017; Donnelly et al., 2000; Lysková et al., 2018).



Obrázek 1: Manifestace onemocnění *T. benhamiae*; A – E typický projev onemocnění u morčat, F – H typické kruhové léze na pokožce, I – K projevy při infekci pokožky s vousy/vlasy. Převzato z (Čmoková et al., v přípravě).



Obrázek 2: Průřez lidské epidermis zobrazující jednotlivé vrstvy. Převzato z (Hiatt et al., 2009).

2.2. Faktory virulence dermatofytů

Schopnost rozkládat keratin, lipidy, elastin a další složky pokožky dermatofytům umožnila stát se úspěšnými kožními patogeny obratlovců včetně člověka (Weitzman and Summerbell, 1995). Tyto látky jsou pro ně hlavními zdroji uhlíku a dusíku. Schopnost rozkládat keratin je mezi mikroorganismy poměrně málo rozšířená kvůli vysoké stabilitě keratinu (Onifade et al., 1998). Za tu jsou v případě α formy keratinu přítomné ve vlasech, chlupích, nehtech a dalších kožních derivátech savců zodpovědné disulfidické můstky mezi molekulami cysteinu (Marchisio, 2000). Právě jejich štěpení je důležitým krokem v rozkladu keratinu. K tomuto účelu slouží proces sulfitolýzy využívající siřičitany vznikající oxidací v keratinu se volně vyskytujících cysteinů enzymem cystein dioxygenázou (Grumbt et al., 2013). Redukovaný keratin je poté endopeptidázami štěpen na polypeptidy, ty jsou exopeptidázami štěpeny na krátké oligopeptidy a volné aminokyseliny, které jsou transportovány do buňky, kde jsou dále využity (Mercer and Stewart, 2018; Monod, 2008). Mezi endoproteázy se řadí subtilisiny, jako zástupce lze jmenovat proteiny Sub 1, Sub 3 a Sub 6, a dále fungalysiny, např. Mep 1 a Mep 3, mezi exoproteázy se pak řadí dipeptidyl peptidázy (DPP IV a DPP V) a leucinové aminopeptidázy (Lap 1 a Lap 2) (Mercer and Stewart, 2018; Mignon et al., 1998; Monod, 2008; Monod et al., 2005).

Vzhledem k výrazné keratinolytické aktivitě dermatofytů byly sekretované proteázy dlouho udávány jako hlavní faktory virulence. Geny pro ně jsou napříč celou skupinou dermatofytů vysoce konzervované (Burmester et al., 2011; Jousson et al., 2004; Lemsaddek et al., 2010; Martinez et al., 2012; Monod, 2008). Jedná se o enzymy, které dle MEROPS databáze (<https://www.ebi.ac.uk/merops/>) spadají do skupin A1 (pepsiny), M12, M14 (karboxypeptidázy A), M19 (membránové dipeptidázy), M20 (glutamátové karboxypeptidázy), M28 (aminopeptidázy Y), M35 (deuterolysiny), M36 (fungalysiny), M43 (cytofagalysiny), S8 (subtilisiny), S9 (prolyl oligopeptidázy), S10 (karboxypeptidázy), S28, S41 (peptidázy procesující C-konec) a S53. Sekretované proteázy slouží zřejmě, kromě k rozkladu keratinu i k dalším funkcím. Většina sekretovaných proteáz působí antigenně, jejich přítomnost aktivuje různé složky imunitního systému hostitele (Beauvais et al., 1997; Brouta et al., 2003; Woodfolk et al., 1998). Opačným příkladem je dipeptidyl peptidáza DPP IV, která působí imunosupresivně na mnoha úrovních imunitní odpovědi (Boonacker et al., 2002; Sterkel et al., 2016). Kromě této schopnosti je dipeptidyl peptidáza DPP IV společně s dipeptidyl peptidázou DPP V spojována i s adherencí k hostitelské tkáni (Mathy et al., 2010), podobně jako subtilisin Sub 3 (Bäguř et al., 2012; Baldo et al., 2010).

Schopnost adherence zřejmě hraje v patogenezi významnou roli. Jednou z dalších skupin proteinů, které ji mohou zajišťovat, jsou hydrofobiny. Jedná se o pro houby specifickou skupinu proteinů zajišťujících kromě přichycení k povrchu i hydrofobnost mycelia a spor, vytváření specifických struktur a u patogenních hub i virulenci (Bayry et al., 2012; Linder et al., 2005). Jedná se o drobné, asi 10kDa velké amfifilní molekuly, které se dělí na hydrofobiny I. a II. třídy. Jejich společným znakem je obsah osmi cysteinových reziduí vytvářejících čtyřidisulfidické můstky, které protein stabilizují v globulární struktuře (Hakanpää et al., 2004; Linder et al., 2005). Hydrofobiny jsou sekretovány na povrch buněčné stěny, kde se samy uspořádají do monomerní vrstvy snižující povrchové napětí vody, čímž usnadňují výměnu plynů (Wang et al., 2005). Ve virulenci patogenních hub se mohou uplatňovat v adherenci, například hydrofobin RodA druhu *Aspergillus fumigatus* se váže k elastinu (Thau et al., 1994). Nejvýznamnější vlastností hydrofobinů je však jejich schopnost maskovat β -(1,3)-glukany, galaktomannany a další antigenní složky buněčné stěny hub před buňkami imunitního systému hostitele (Aimanianda et al., 2009). Hydrofobiny jsou významnou složkou buněčné stěny také u dermatofytů, k up-regulaci genu kódujících tyto proteiny dochází při vystavení dermatofytů stresu, ale i pokud je jako zdroj výživy dostupný keratin, nejspíš se proto uplatňují i v iniciační fázi infekce (Martins et al., 2019). U *T. benhamiae* byl identifikován hydrofobin HypA, který zajišťuje adherenci k hostitelské tkáni a zároveň snižuje schopnost imunitních buněk hostitele tento patogen rozpoznat a zlikvidovat (Heddergott et al., 2012).

Podobné vlastnosti, tedy schopnost adherovat k hostitelské tkáni a maskovat patogen před imunitním systémem, mají i proteiny s LysM (lysin motif) doménou (Buist et al., 2008; De Jonge and Thomma, 2009; Kar et al., 2019; Kombrink and Thomma, 2013). Proteiny obsahující tuto doménu jsou virulencním faktorem mnoha mikroorganismů a vyskytují se u mnoha druhů hub, které napadají rostliny i živočichy (De Jonge and Thomma, 2009; Kar et al., 2019; Kombrink and Thomma, 2013; Muraosa et al., 2019). I dermatofyty produkují různý počet proteinů s LysM doménou, a to od devíti u druhu *T. verrucosum* až po 31 u *M. canis* (Martinez et al., 2012). Jedná se o heterogenní skupinu proteinů, jejichž společnou vlastností je přítomnost 44 aminokyselin dlouhých a napříč skupinami prokaryot i eukaryot konzervovaných LysM domén, vážících různé glykoproteiny a chitin (Buist et al., 2008; Garvey et al., 1986). Chitin, hlavní složka buněčné stěny hub, je hostiteli houbových patogenů dobře identifikován. Už rostliny disponují mechanismy rozpoznávajícími chitin a tedy i přítomnost potenciálního houbového patogenu (Kombrink and Thomma, 2013; Liu et al., 2012; Sánchez-Vallet et al., 2013). Také imunitní systém savců dokáže přítomnost chitinu detekovat a rychle na ni reagovat (Lee et al., 2008). Společnou obrannou strategií hostitelských organismů je

produkce chitináz, které mají rozrušovat buněčnou stěnu hub (De Jonge and Thomma, 2009; Kombrink and Thomma, 2013; Lee et al., 2008). Možným účinkem proteinů s LysM doménou je schopnost vychytávat chitin uvolňující se při růstu hyf maskovat ho tak před imunitním systémem hostitele (De Jonge and Thomma, 2009). Tyto proteiny také v případě rostlin inhibují dimerizaci, a tedy aktivaci chitinových receptorů rostlin (Sánchez-Vallet et al., 2013). V případě savců, kde se zatím pouze polemizuje o roli chitináz v obraně proti patogenům podobný fenomén pozorován nebyl (Lee et al., 2008).

Pokud hovoříme o maskování dermatofytů před imunitním systémem hostitele, je třeba zmínit také melanin – tmavý sekundární metabolit uplatňující se ve virulenci mnoha patogenních hub (Casadevall and Pirofski, 2009; Taborda et al., 2008; Taylor et al., 1987; Youngchim et al., 2011). Melanin u hub funguje jako antioxidant, který pomáhá snášet oxidativní stres (Jacobson et al., 1995) a zároveň je možným zhášedčem na cytokinech založené imunitní odpovědi (Mohagheghpour et al., 2000). Dermatofyty produkují tento pigment během infekce, jeho role v patogenezi, ostatně jako role mnoha dalších potenciálních virulenních faktorů není dosud známá.

2.3. Sekundární metabolity jako nástroje v taxonomii a diagnostice

Sekundární metabolity hub, jako například výše zmíněný melanin, jsou nejen potenciálními faktory virulence, ale i potenciálním nástrojem k určování druhů. Chemotaxonomie, tedy metoda klasifikace a identifikace organismů na základě spektra produkovaných látek, je využívána především u vláknitých hub, které jich produkují široké spektrum (Frisvad et al., 2008). Jako silný nástroj pro identifikaci druhů a taxonomii se sekundární metabolity ukázaly být především jako součást polyfázického přístupu u rodů *Penicillium* (Frisvad and Filtenborg, 1990; Frisvad and Samson, 2004), *Talaromyces* (Frisvad et al., 1990), *Fusarium* (Thrane et al., 2004) a různých zástupců čeledi *Xylariaceae* (Stadler et al., 2010, 2004, 2001).

Ze skupin látek využívaných k chemotaxonomii lze jmenovat nejčastěji využívané polyketidy, které jsou díky svým častým bioaktivním vlastnostem dobře prostudovány a charakterizovány (Hussain et al., 2017). Další slibnou skupinou jsou volatilní organické látky. Jde o malé, při normálních teplotách detekovatelné molekuly, jejichž spektrum je druhově specifické a lze ho použít například k identifikaci druhů rodu *Penicillium* (Larsen and Frisvad, 1995a, 1995b). V klinické praxi lze tyto látky díky jejich rychlé a snadné identifikaci pomocí tzv. „elektronických nosů“ využít k identifikaci bakteriálních (Duffy and Morrin, 2019; Ratiu

et al., 2019) i houbových patogenů (Koo et al., 2014; Rees et al., 2017). Další látky potenciálně vhodné pro chemotaxonomii hub jsou mastné kyseliny (Blomquist et al., 1992) a sfingolipidy (Olsen and Jantzen, 2001).

Genom dermatofytů obsahuje vysoký počet klastrů genů pro produkci sekundárních metabolitů, jedná se o mnoho druhů polyketid-syntáz, neribozomálních syntáz proteinů, a dokonce i o enzymy účastnící se syntetických drah pro tvorbu námelových alkaloidů (Burmester et al., 2011; Keller et al., 2005; Martinez et al., 2012; Wallwey et al., 2012). Spektrum sekundárních metabolitů produkovaných dermatofyty však zatím nebylo charakterizováno. Z doposud popsaných látek lze jmenovat vysoce toxické metabolity xanthomegnin, vioxanthin a viopurpurin (Blank et al., 1963; Fujii et al., 1966; Gupta et al., 2000; Ng et al., 1969; Wirth et al., 1965) a Neosartoricin B (Yin et al., 2013). Polyketid xanthomegnin sice doprovází infekci kožní tkáně a nehtů způsobenou druhem *T. rubrum* ve velké řadě případů (Gupta et al., 2000), tuto látku ale neprodukuje vždy všechny kmeny tohoto druhu, je navíc produkována i dalšími druhy dermatofytů, a nehodí se proto k diagnostickým účelům (Kandemir et al., 2015).

2.4. Studium transkriptomu dermatofytů

Transkriptomika, tedy studium buněčných dějů na úrovni genové exprese, je poměrně starou metodou. První pokusy o studium transkriptomu se datují do 80. let 20. století. Největší rozmach však zažívá zejména v posledních deseti letech, a to především díky vývoji a stále lepší cenové dostupnosti metod sekvenování nové generace (Lowe et al., 2017; Wang et al., 2009). Ke studiu transkriptomů lze využít různé metodické přístupy, nejčastěji používané jsou RNA čipy, kvantitativní polymerázová řetězová reakce využívající reverzní transkripci (RT-qPCR) a sekvenace RNA (RNAseq) (Lowe et al., 2017). Metoda RNA čipů využívá princip hybridizace a fluorescenčního značení, její výhodou je nízká cena a vysoká výkonnost, nevýhodou je nízká specifita a senzitivita, největším limitem je možnost zkoumat pouze již známé sekvence (Anamika et al., 2016). Toto omezení se týká i metody RT-qPCR, ta však oproti metodě RNA čipů umožňuje již známé transkripty přesně kvantifikovat (Anamika et al., 2016; Lowe et al., 2017). Nejprogresivnější metodou je RNAseq, jíž získaná data jsou kvalitativního i kvantitativního charakteru a která umožňuje identifikaci nových transkriptů, a v případě patogenních organismů tedy i nových potenciálních faktorů virulence, její největší nevýhodou je však vysoká cena a vysoké nároky na znalosti bioinformatiky při zpracování získaných dat (Anamika et al., 2016; Lowe et al., 2017; Wang et al., 2009).

Transkriptom dermatofytů byl studován všemi výše zmíněnými metodami, a právě transkriptomika začala vnášet světlo do zatím jen málo prozkoumané patogeneze těchto hub. Pomocí RNA čipů a následné RT-qPCR validace byly sledovány známé a popsány nové potenciální geny virulence u druhu *T. rubrum* při růstu na médiích bohatých na různé zdroje proteinů. Potvrzena byla zejména role sekretovaných proteáz (jmenovitě Sub 3, Sub 4, Sub 5, Mep 3, Mep 4, Lap 1, Lap 2 a MCPA) v degradaci proteinů, dále byla pozorována up-regulace exprese genů pro enzymy účastníci se glyoxylátového cyklu, konkrétně malát syntázy a izocitrát lyázy a dále monooxygenázy cytochromu p450 při růstu na médiu bohatém na keratin (Zaugg et al., 2009). Stejnou metodikou studia transkriptomů bylo podobné spektrum produktů sledováno u druhu *T. benhamiae*, tentokrát však při srovnání růstu v tekutých médiích s různým zdrojem proteinů a při růstu na experimentálně nakažených morčatech (Staib et al., 2010). V této studii byla při růstu v tekutých médiích pozorována up-regulace podobného spektra genů jako ve studii předchozí. Zajímavé je, že při růstu *in vivo* nedošlo k up-regulaci exprese téměř žádné ze sekretovaných proteáz exprimovaných při růstu v tekutých médiích, jedinou výjimkou byly proteázy z rodiny subtilisinů, konkrétně Sub 3 (její exprese však byla zvýšena jen mírně), dále Sub 6, Sub 7, Sub 1, Sub 2 a metalokarboxypeptidáza A (MCPA). Při růstu na živých morčatech byly identifikovány geny, jejichž transkripci indukovala přítomnost hostitele oproti tekuté kultuře, mnoho však bylo neidentifikovaných. Geny kódující produkty se známou funkcí zahrnovaly protein příbuzný s opsinem, transportér monosacharidů, potenciální oxidoreduktázu a opět enzymy glyoxylátového cyklu malát syntázu a izocitrát lyázu (Staib et al., 2010). Malá nebo téměř žádná změna v genové expresi sekretovaných proteáz (vyjma proteáz DPP IV a Lap 2) byla pozorována při RNAseq analýze druhu *T. rubrum* kultivovaném s lidskými keratinocyty. Naopak geny, jejichž exprese se lišila, spadaly do skupin genů pro různé přenašeče a transportéry, nechyběla ani oxidoreduktáza a opět izocitrát lyáza a malát syntáza (Petrucelli et al., 2018). Rozsáhlá studie sledující expresi druhu *T. benhamiae* kultivovaného v různých tekutých médiích a *in vivo* na morčatech přinesla poněkud protichůdné výsledky sedřívě zmiňovanými studiemi. Autoři pozorovali up-regulaci exprese genů pro proteázy Sub 6, a Sub 10 a naopak down-regulaci genů pro Sub 3, Sub 4, Lap 1, Lap 2, Mep 3 a MCPA v *in vivo* versus *in vitro* podmínkách. Překvapivě nebyla sledována změna v expresi genů pro enzymy glyoxylátového cyklu (Tran et al., 2016).

2.5. Využití kožních modelů při studiu dermatofytů

Pokožka obratlovců je komplexní, na organickou hmotu (keratin, lipidy) bohaté prostředí s poměrně vysokou teplotou (přes 30°C) a kyselým pH (v závislosti na druhu hostitele se pohybuje v hodnotách pH 4 až 6) (Matousek and Campbell, 2002). Kultivace dermatofytů na umělých médiích (agarových i tekutých) obsahujících polysacharidy různého původu jako zdroj energie není pro studium patogeneze dostačující. Nejvhodnější jsou z hlediska napodobení reálných podmínek mykotické infekce pokusy prováděné *in vivo*, při nichž jsou nejčastěji používána běžná laboratorní zvířata jako jsou myši a morčata (Cambier et al., 2014; Saunte et al., 2008; Sorensen et al., 1999). Vzhledem k hostitelské specifitě některých druhů dermatofytů, například antropofilního druhu *T. rubrum* nebo častého kočičího patogenu *Microsporum canis*, nemohou být výsledky *in vivo* pokusů na hlodavcích příliš relevantní. Pokusy *in vivo* jsou navíc finančně náročné. Proto jsou vyvíjeny nejrozličnější *in vitro* a *ex vivo* modely, které jsou dostupnější, etičtější a vhodnější pro hostitelsky specifické druhy.

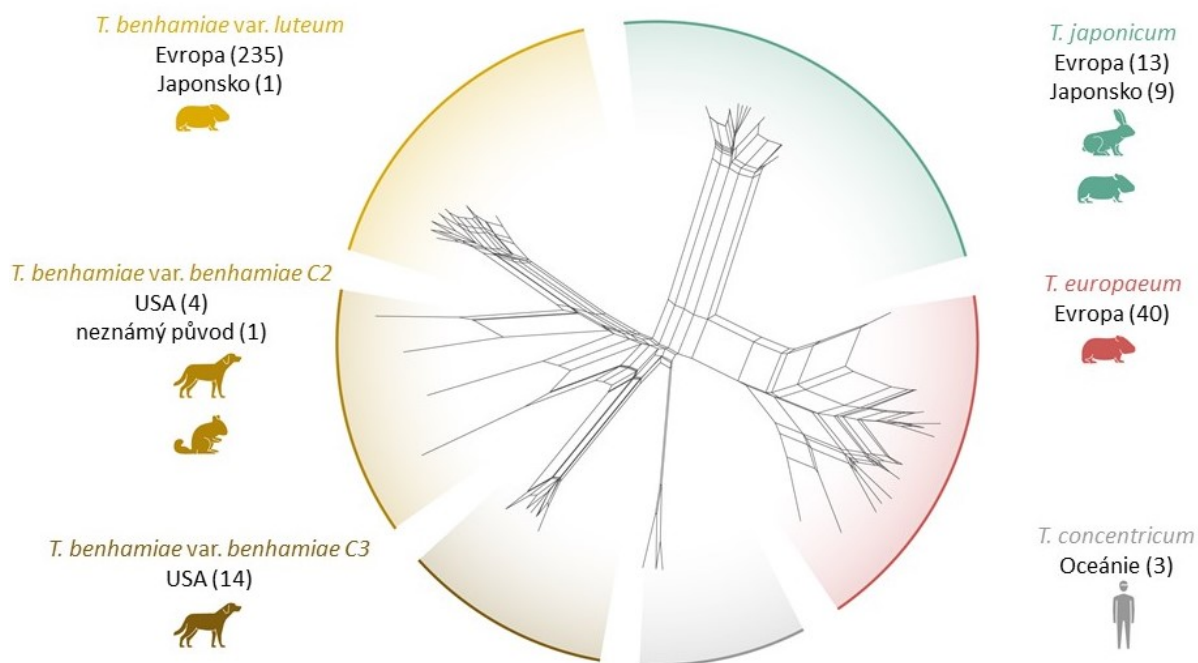
Nejjednodušší, ale zároveň málo vypovídající jsou *in vitro* metody využívající mrtvou tkáň, např. korneocyty přichycené na adhezních páskách (Aljabre et al., 1992), lidské nehty (Rashid et al., 1995) a kopyta skotu (Monti et al., 2011). Pokročilejším nástrojem je společná kultivace s jednobuněčnými kulturami, nejčastěji keratinocyty (Aljabre et al., 1993; Petrucelli et al., 2018; Shiraki et al., 2006), nebo s buňkami účastnicími se imunitní reakce (Heddergott et al., 2012). Tento přístup má výraznou výhodu v možnosti sledování dějů nejen v buňkách hub, ale i buňkách hostitelských. Dobrým a vysoce reprodukovatelným, avšak na přípravu náročným modelem je kultivace na rekonstruované kožní tkáni (Faway et al., 2007; Poumay et al., 2004; Tabart et al., 2007). Kompromisem mezi *in vivo* pokusy na živých zvířatech a *in vitro* modely rekonstruovaných tkání jsou *ex vivo* modely založené na kožních explantátech. Tyto modely zachovávají oproti rekonstruované tkáni komplexitu kůže, umožňují navíc použít tkáň jinak těžko dostupné, např. lidskou kůži (Corzo-León et al., 2019; Smijs et al., 2007). Krom lidské kůže byla pro studium dermatofytů, a to dokonce druhu *T. benhamiae*, použita i kůže morčat (Baumbach et al., 2020; Baumbach et al., 2020; Duek et al., 2004).

2.6. Epidemiologie komplexu *Trichophyton benhamiae*

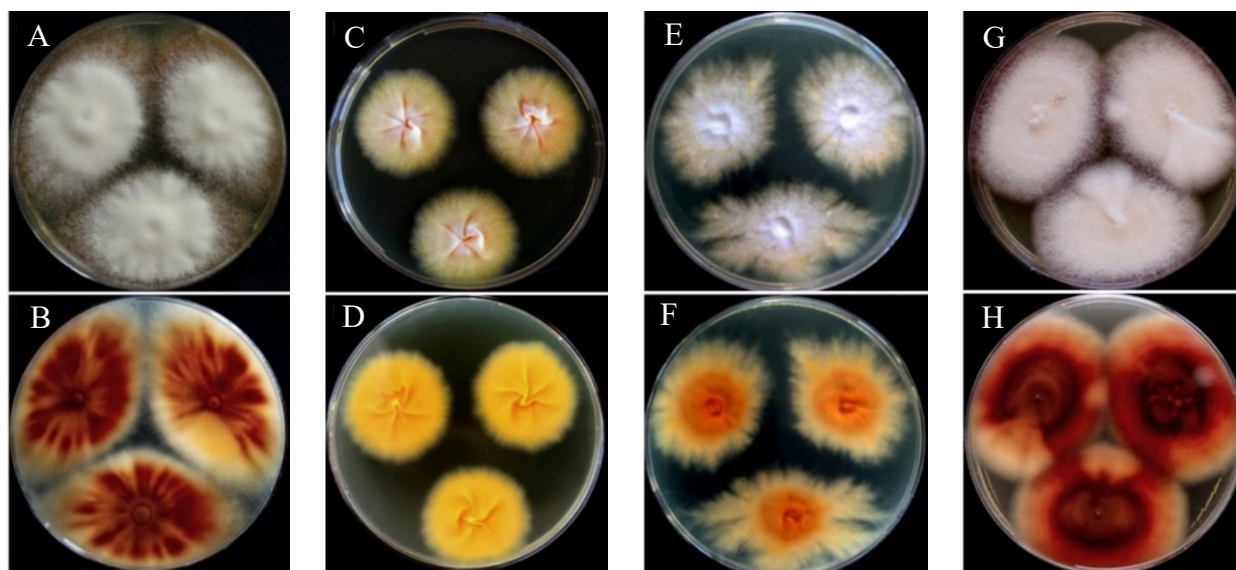
Kmeny druhu *Trichophyton benhamiae* vykazují velkou fenotypovou variabilitu v mikro a makroskopických znacích. Jsou proto některými autory rozdělovány na zástupce tzv. „bílého fenotypu“ a „žlutého fenotypu“ (Brasch and Wodarg, 2015; Hesse et al., 2019, 2017; Sabou et al., 2018). Na základě polyfázického přístupu zahrnujícího multilokusovou analýzu, analýzu mikrosatelitů, mikromorfologie, párovacích typů a MALDI TOF MS byl tento druh označen za druhový komplex zahrnující dvě variety a to *T. benhamiae* var. *benhamiae* a *T. benhamiae* var. *luteum*, dále již popsáný druh *T. concentricum* a dva nově popsané, blízké příbuzné druhy *T. europaeum* a *T. japonicum* (obrázek číslo 3) (Čmoková et al., v přípravě). Na základě této studie se ukázalo, že takzvaný „bílý fenotyp“ zahrnuje populace *T. benhamiae* var. *benhamiae*, *T. europaeum* a *T. japonicum*, vyznačující se hojnou produkcí makrokonidií i mikrokonidií, tvorbou spirálních hyf a produkcí červeného až hnědého pigmentu na sladovém agaru. Od této skupiny se „žlutý fenotyp“ tvořený zástupci *T. benhamiae* var. *luteum* významně liší. Vyznačuje se pomalým růstem, absencí makrokonidií a spirálních hyf, nízkou produkcí mikrokonidií a produkcí žlutého pigmentu na všech zkoumaných médiích (obrázek číslo 4) (Čmoková et al., v přípravě). Hostitelské spektrum obou fenotypů komplexu *T. benhamiae* zahrnuje kromě již zmíněného morčete domácího (*Cavia aperea porcellus*) také psa domácího (*Canis lupus f. familiaris*), urzona kanadského (*Erethizon dorsatum*) a další savce včetně člověka (Hubka et al., 2018, Čmoková et al., v přípravě).

Jednotlivé populace komplexu *T. benhamiae* se liší v preferenci těchto hostitelů i svou distribucí. Populace *T. benhamiae* var. *benhamiae* se vyskytuje převážně v USA, kde způsobuje onemocnění psů, jeho zdroj je však předpokládán mezi urzony. V Evropě se vyskytují zřejmě původní zástupci, *T. europaeum* a *T. japonicum* (rozšířený také v Asii), které infikují malé savce a jejich majitele. Po roce 2010 jsou však postupně doplňovány populací *T. benhamiae* var. *luteum*, pravděpodobným původcem nynější epidemie způsobené zástupci komplexu *T. benhamiae* (Čmoková et al., v přípravě). Její začátek se datuje k přelomu milénia, kdy se zástupci komplexu *T. benhamiae*, do té doby izolovaní z morčat i lidí jen vzácně, začali rapidně šířit (Hubka et al., 2018; Nenoff et al., 2014; Sabou et al., 2018; Symoens et al., 2013). V posledních deseti letech se dokonce tento komplex v některých zemích stal jedním z nejčastějších zoofilních původců dermatofytóz u lidí (Drouot et al., 2009; Hiruma et al., 2015; Nenoff et al., 2014; Sabou et al., 2018; Symoens et al., 2013). V České republice je dle posledních studií způsobeno zástupci komplexu *T. benhamiae* 7,2 % ze všech u lidí

diagnostikovaných dermatofytóz, jedná se dokonce o nejčastěji se vyskytujícího druh ze skupiny zoofilních dermatofytů (Hubka et al., 2014).



Obrázek 3: Rozdělení komplexu *T. benhamiae* do populací na základě polyfázického přístupu, zahrnujícího multilokusovou analýzu a analýzy mikrosatelitů, morfologie, párovacích typů a MALDI TOF; u populací je zobrazen nejčastější hostitel, místo výskytu a počet kmenů. Převzato a upraveno z (Čmoková et al., v přípravě).



Obrázek 4: Makromorfologie populací komplexu *T. benhamiae* na bramborovém dextrózovém agaru, kultivované 14 dní při 30 °C; A,B = *T. benhamiae* var. *benhamiae*, C,D = *T. benhamiae* var. *luteum*, E,F = *T. europaeum*, G,H = *T. japonicum*; A,C,E,G = *invers*, B,D,F,H = *revers*. Převzato a upraveno z (Čmoková et al., v přípravě).

3. METODY

3.1. Vybrané kmeny

Pro analýzy genové exprese i produkce volatilních organických látek provedených v této diplomové práci byly od každé populace komplexu *T. benhamiae* vybrány tři kmeny, z nichž jeden byl pro danou populaci kmen typový. Seznam těchto kmenů je uveden v tabulce číslo 1. Dlouhodobě byly tyto kmeny uchovávány ve tmě v chladicí místnosti při 6 °C na Petriho miskách s agarovým médiem MEA (malt extract agar). Zástupci *T. benhamiae* patří do skupiny úrovně ochrany 2. stupně (biosafety level 2; BSL-2), se všemi vzorky proto bylo nakládáno podle bezpečnostních pravidel pro tuto skupinu (Burnett et al., 2009).

Tabulka 1: Seznam kmenů použitých pro analýzy genové exprese a produkce volatilních organických látek, jejich příslušnost ke konkrétní populaci uvnitř komplexu *T. benhamiae* a zdroj ze kterého byly kmeny získány.

Populace	Kmen	Zdroj	Poznámka
<i>T. benhamiae</i> var. <i>benhamiae</i>	IHEM 4710	Scientific Institute of Public Health, Belgie (Dr. Dirk Stubbe) - BCCM/IHEM sbírka kultur hub	Typový kmen
<i>T. benhamiae</i> var. <i>benhamiae</i>	IHEM 3287	Scientific Institute of Public Health, Belgie (Dr. Dirk Stubbe) - BCCM/IHEM sbírka kultur hub	
<i>T. benhamiae</i> var. <i>benhamiae</i>	USA 3366	University of Illinois at Urbana-Champaign, USA (Dr. Lois L. Hoyer)	
<i>T. benhamiae</i> var. <i>luteum</i>	IHEM 25742	Scientific Institute of Public Health, Belgie (Dr. Dirk Stubbe) - BCCM/IHEM sbírka kultur hub	Typový kmen
<i>T. benhamiae</i> var. <i>luteum</i>	SK 1242/12	Dermatovenerologická klinika 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze (doc MUDr. Magdalena Skořepová, CSc.)	= CCF 4852
<i>T. benhamiae</i> var. <i>luteum</i>	IHEM 25077	Scientific Institute of Public Health, Belgie (Dr. Dirk Stubbe) - BCCM/IHEM sbírka kultur hub	
<i>T. europaeum</i>	IHEM 20161	Scientific Institute of Public Health, Belgie (Dr. Dirk Stubbe) - BCCM/IHEM sbírka kultur hub	Typový kmen
<i>T. europaeum</i>	IHEM 25062	Scientific Institute of Public Health, Belgie (Dr. Dirk Stubbe) - BCCM/IHEM sbírka kultur hub	
<i>T. europaeum</i>	ME 192/12	Pardubická krajská nemocnice, a. s. (MUDr. Karel Mencl, CSc.)	
<i>T. japonicum</i>	IHEM 17701	Scientific Institute of Public Health, Belgie (Dr. Dirk Stubbe) - BCCM/IHEM sbírka kultur hub	Typový kmen
<i>T. japonicum</i>	VUT 97010	Nihon University School of Veterinary Medicine, Japonsko (Dr. Rui Kano)	
<i>T. japonicum</i>	NUBS 13002	Nihon University School of Veterinary Medicine, Japonsko (Dr. Rui Kano)	

3.2. Analýza genové exprese

3.2.1. Kultivace v tekutém médiu

Všechny kmeny vybrané pro analýzu genové exprese byly ve čtyřech opakováních kultivovány v Sabouraudově tekutém médiu (složení dle tabulky číslo 2). Kultivace probíhala při 30 °C bez třepání, ve tmě, po dobu 8 dní.

Tabulka 2: Složení Sabouraudova tekutého média

Složka	Hmotnostní koncentrace [g/l]
D-glukóza*	20
Pepton*	10
Celkové pH 6,4	

* (HiMedia, Bombaj, Indie)

3.2.2. Kultivace na myší kožní tkáni

Vybrané kmeny byly předkultivovány v Sabouraudově tekutém médiu (tabulka číslo 2) při 30 °C bez třepání, po dobu 8 dní. Poté byly inokulovány ve čtyřech opakováních na myší kožní explantáty, jak je uvedeno níže.

Myši pro odběr kožních explantátů byly poskytnuty Laboratoří buněčné a molekulární imunologie Mikrobiologického ústavu AV ČR a zvěřincem Mikrobiologického ústavu AV ČR. Zvířata darovaná Laboratoří buněčné a molekulární imunologie byla použita pro vyvinutí a optimalizaci protokolu pro práci s kožními explantáty a jejich kultivaci. Jednalo se o zvířata používaná jako kontrolní vzorky pravidelně usmrcované při experimentech probíhajících na tomto pracovišti. Jednalo se o zdravé dospělé jedince, kmen BALB/c, a to obou pohlaví. Pro samotný pokus pak byly použity 3 měsíce starí zdraví samci BALB/c darovaní zvěřincem Mikrobiologického ústavu. Jednalo se o jedince usmrcované pro nadpočetnost v rámci běžné údržby zvěřince. Pro tento pokus tedy nebylo nutné svolení etické komise.

Postup zpracování kůží a kultivace byl vytvořen na základě již publikovaných prací popisujících práci s kožními štěpy, či kultivaci dermatofytů na kožních tkáních a jejich modifikací (Duek et al., 2004; Ge et al., 2011; Peled et al., 1991; Poumay et al., 2004).

Před usmrcením byly myši oholeny elektrickým stříhacím strojkem Aesculap Exacta GT 416 (B. Braun Medical, Melsungen, Německo) a usmrceny dislokací krčního obratle. Bezprostředně po smrti zvířete byl z dorsální oblasti ošetřené 70% ethanolem odebrán vzorek kůže o velikosti cca 2 x 2 centimetry zbavený tukové tkáně.

Poté bylo testováno několik způsobů dezinfekce kožních štěpů. Jedna skupina vzorků byla ošetřena pouze ethanolem, poté byly celkem třikrát po dobu 10 minut ošetřeny 1% roztokem sodné soli penicilinu G (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) a sulfátové soli streptomycinu (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) s průběžným oplachem fosfátového pufru PBS (složení dle tabulky číslo 3). Druhá skupina vzorků byla ošetřena 0,5% roztokem chlornanu sodného, poté byly vzorky celkem třikrát po dobu 10 minut ošetřeny 1% roztokem sodné soli penicilinu G a sulfátové soli streptomycinu s průběžným oplachem PBS. Třetí skupina kožních vzorků byla na 30 minut uložena na led do 0,1% roztoku benzalkonium bromidu (Ajatin Plus roztok 10 %, Profarma, Jablonec nad Nisou, Česká republika), poté byly vzorky celkem třikrát po dobu 10 minut ošetřeny 1% roztokem sodné soli penicilinu G a sulfátové soli streptomycinu s průběžným oplachem PBS. Jako nejvhodnější dezinfekční látka byl vybrán benzalkonium bromid (viz Výsledky), všechny vzorky zahrnuté do analýzy genové exprese byly ošetřeny tímto způsobem.

Dezinfikované kožní explantáty byly uloženy do šestijamkových destiček na kousky sterilní gázy. K nim byl přidán 1 ml roztoku pro kultivaci tkání obsahující teplem inaktivované fetální bovinní sérum Gibco (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) tak, aby v kontaktu s roztokem byla pouze gáza a spodní strana kůže, nikoliv svrchní strana s inokulem. Plné složení kultivačního roztoku je uvedeno v tabulce číslo 4. Na připravené vzorky kůže byly jednobodově inokulovány 4 µl suspenze vytvořené homogenizací předkultivačních kultur rostoucích v tekutém Sabouraudově médiu po dobu 8 dní. Inokulovány byly vždy 3 kmeny od každé populace, každý kmen vždy na čtyři až pět kusů kůže. Pokus byl doplněn o šest kontrolních vzorků bez inkula. Kožní explantáty byly inkubovány v inkubátoru MCO-170AICUV-PE (Panasonic, Kadoma, Japonsko) při 30 °C v 5 % atmosféře CO₂. Teplota 30 °C byla zvolena na základě empirických zkušeností s udržováním kožních štěpů, zároveň se jedná o teplotu ideální pro růst patogenních dermatofytů. Kultivace probíhala po dobu 8 dní, kultivační roztok byl ve sterilních podmínkách denně měněn, aby byla zajištěna výživa štěpů a zároveň nedocházelo k bakteriální kontaminaci. Starý kultivační roztok byl mikroskopován, aby byla případná kontaminace včas odhalena. S myšími kožními explantáty se po celou dobu pracovalo sterilně v laminárním boxu Airstream AC2-5E8 (ESCO, Portland, USA).

Tabulka 3: Složení fosfátového pufru (PBS)

Složka	Hmotnostní koncentrace [g/l]
NaCl	8,0
KCl	0,2
Na ₂ HPO ₄	1,44
KH ₂ PO ₄	0,24
Celkové pH 7,4	

Tabulka 4: Kultivační roztok pro myší kožní explantáty

Složka	obj. %
Fetální bovinní sérum	10,0
Pufr (tab. č. 5)	8,0
Roztok PenStrep	1,0
H ₂ O	81,0

Tabulka 5: Složení pufru pro kultivační roztok

Složka	Hmotnostní koncentrace [g/l]
NaCl	8,0
KCl	0,4
Na ₂ HPO ₄	0,0875
KH ₂ PO ₄	0,0625
MgSO ₄	0,2
D-glukóza	6,25
Celkové pH 6,4	

3.2.3. Extrakce a zpracování RNA

Celý postup práce s RNA probíhal v laminárním PCR boxu SCR-2A (ESCO, Portland, USA) určeném pouze k práci s RNA, aby byla minimalizována možnost kontaminace vzorků RNázami které mohou degradovat vzorky. V rámci optimalizace protokolu pro izolaci a práci s RNA dermatofytů byly vyzkoušeny dvě metody extrakce RNA, a to drcení mycelia v tekutém dusíku nebo drcení mycelia pomocí skleněných kuliček v kombinaci se dvěma metodami izolace RNA. Drceno bylo vždy zhruba 100 mg houbové biomasy. V případě drcení pomocí skleněných kuliček byla biomasa přidána k 0,5 g sterilních kuliček o průměru 0,5 mm (BioSpec Products, Bartlesville, USA) buď v 1 ml látky TRIzol (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), nebo 500 µl lyzačního pufru ze sady NucleoSpin RNA Plant and Fungi (Life System Designs, Muri, Švýcarsko). Poté byly vzorky třepány v přístroji FastPrep-24 (MP Biomedicals,

Irvine, USA) při rychlosti 6 m/s po dobu 40 sekund. V případě drcení v tekutém dusíku byla biomasa rozdrvena pomocí sterilních třecích misek a tloučku (vždy jedna miska a tlouček pro jeden kmen). Miska byla nejprve ochlazená nalitím a odpařením dusíku, poté byl do misky opět dolit dusík, do kterého bylo vloženo cca 100 mg houbové biomasy, rozdrvená biomasa byla co nejrychleji přenesena do 1 ml TRIzol, či 500 µl lyzačního pufru tak, aby se zabránilo roztání vzorku a tím i degradaci RNA. Poté byla RNA izolována v případě sady NucleoSpin RNA Plant and Fungi dle instrukcí výrobce, v případě látky TRIzol byl použit modifikovaný protokol zahrnující přídatné čistící kroky minimalizující kontaminaci proteiny, fenolem a guanidiovými solemi (Toni et al., 2018), postup byl následující:

- Ke vzorkům bylo přidáno 250 µl ledově vychlazeného chloroformu
- Vzorky byly po dobu 15 vteřin třepány v ruce a inkubovány v pokojové teplotě po dobu 10 minut
- Poté byly vzorky centrifugovány 15 minut při 16000 g při teplotě 4 °C
- Byla odebrána svrchní vrstva tak, aby se při odsávání špička pipety nedotkla spodní (hrozí kontaminace fenolem) ani prostřední (hrozí kontaminace DNA) vrstvy
- Svrchní vrstva byla v nové zkumavce smíchána s 200 µl ledově vychlazeného chloroformu
- Vzorky byly po dobu 15 vteřin třepány v ruce a inkubovány v pokojové teplotě po dobu 3 minut
- Poté byly vzorky centrifugovány 15 minut při 16000 g při teplotě 4 °C
- V nové zkumavce byla svrchní vrstva smíchána s 550 µl isopropanolu pokojové teploty
- Vzorky byly po dobu 15 vteřin třepány v ruce a inkubovány v pokojové teplotě po dobu 10 minut
- Poté byly vzorky centrifugovány 15 minut při 16000 g při teplotě 4 °C
- Supernatant byl odlit
- K peletě byl přidán 1 ml ledově vychlazeného 75% ethanolu, připraveného smícháním 96% ethanolu s PCR vodou
- Poté byly vzorky centrifugovány 5 minut při 7500 g při teplotě 4 °C
- Předchozí dva kroky byly dvakrát opakovány
- Supernatant byl odlit, vzorky byly krátce centrifugovány a poté byly pipetou úplně odstraněny zbytky ethanolu

- Peleta byla vysušena v pokojové teplotě tak, aby ve zkumavce nezbyl žádný ethanol a peleta zprůhledněla
- Peleta byla resuspendována v 50 μ l PCR vody nahřáté na 65 °C

K centrifugaci vzorků byla použita centrifuga Eppendorf Centrifuge 5804 R (Eppendorf, Hamburk, Německo). K pipetování byly použity pipety Eppendorf Research plus (Eppendorf, Hamburk, Německo). K resuspendaci RNA a ředění ethanolu byla použita PCR voda (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), certifikovaná jako neobsahující RNázy.

Kvalita RNA získané různou kombinací popsaných přístupů byla ověřena na 1% agarózovém gelu s 0,5 μ l ethidium bromidu (oboje HiMedia, Bombaj, Indie) a 1 μ l HyperLadder 50bp (Bioline Reagents Limited, Londýn, UK). Množství izolované RNA bylo změřeno přístrojem Qubit 2.0 Fluorometer za využití Qubit RNA HS Assay Kit a RNA BR Assay Kit (vše Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). K měření byly použity vždy 2 μ l RNA. Jako nejlepší byla zvolena kombinace drcení v tekutém dusíku a izolace látkou TRIzol (viz Výsledky) všechny vzorky zahrnuté do analýz v této diplomové práci byly tedy zpracovány tímto způsobem.

Kvalita izolované RNA byla také zkontrolována přístrojem NanoDrop 1000 UV/VIS Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), k měření byly použity vždy 2 μ l. Byly vybrány pouze vzorky s poměrem 260/280 vyšším než 1,8 a poměrem 260/230 vyšším než 2,0. V případě nižších hodnot byly vzorky přečištěny následujícím způsobem:

- Vzorky byly PCR vodou naředěny na výsledný objem 500 μ l
- Poté k nim bylo přidáno 25 μ l octanu sodného a 500 μ l isopropanolu pokojové teploty
- Vzorky byly po dobu 20 minut inkubovány v pokojové teplotě
- Poté byly vzorky centrifugovány 15 minut při 16000 g při teplotě 4 °C
- Peleta byla opláchnuta 1 ml 75% ledově vychlazeného ethanolu, poté byl ethanol odlit
- Předchozí krok byl opakován
- Vzorky byly krátce centrifugovány, poté byly zbytky ethanolu odstraněny pipetou
- Peleta byla v pokojové teplotě vysušena tak, aby ve zkumavce nezbyl žádný ethanol a peleta zprůhledněla
- Peleta byla resuspendována v 50 μ l PCR vody pokojové teploty

Poté byla přístrojem NanoDrop znovu zkontrolována kvalita přečištěné RNA, vyhovující vzorky byly zahrnuty do analýzy, nevhovující byly odstraněny.

Izolovaná RNA byla ošetřena 1 µl RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) aby bylo zabráněno degradaci vzorku působením ribonukleáz. Případná DNA kontaminace byla ze vzorků odstraněna TURBO DNA-free Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) následujícím způsobem:

- Vzorky byly PCR vodou naředěny na výsledný objem 50 µl
- K vzorkům byl přidán 1 µl TURBO DNase a 5 µl 10X TURBO DNase Buffer
- Vzorky byly inkubovány při 37 °C po dobu 30 minut
- Vzorky byly vortexovány po dobu 3 sekund
- K vzorkům bylo přidáno 5 µl DNase Inactivation Reagent
- Vzorky byly po dobu 5 minut inkubovány při pokojové teplotě, během této doby byly třikrát vortexovány po dobu 3 sekund
- Vzorky byly centrifugovány při 10000 g po dobu 90 sekund
- Supernatant obsahující přečištěnou RNA byl přemístěn do nové zkumavky

Úspěšnost odstranění DNA byla zkontrolována horizontální elektroforézou na 1% agarózovém gelu s 0,5 µl ethidium bromidu (oboje HiMedia, Bombaj, Indie) a 1 µl HyperLadder 50bp (Bioline Reagents Limited, Londýn, UK), v případě neúspěšnosti byla procedura opakována. Koncentrace RNA byla změřena přístrojem Qubit 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) za využití Qubit RNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) a RNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Zpracovaná RNA byla okamžitě zmrazena a až do další analýzy uskladněna při -80 °C.

3.2.4. RNAseq

Analýza genové exprese sekvenací transkriptomu byla provedena na kmenech NUBS 13002 (*T. japonicum*) a IHEM 25742 (*T. benhamiae* var. *luteum*). Celkem se jednalo o 5 vzorků: NUBS 13002 kultivovaný v tekutém Sabouraudově médiu po dobu 8 dní a na myším kožním explantátu po dobu 6 dní a 8 dní a IHEM 25742 kultivovaný v tekutém Sabouraudově médiu po dobu 8 dní a na myším kožním explantátu po dobu 8 dní.

Za účelem přípravy knihoven byla z celkové izolované RNA odstraněna rRNA pomocí NEBNext Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module (New England Biolabs, Ipswich, USA) dle instrukcí výrobce. K analýze byl použit 1 µg RNA. Úspěšnost procedury, množství a kvalita zbylé RNA byla ověřena pomocí přístroje Agilent 2100 Bionalyzer (Agilent Technologies,

Santa Clara, USA) s využitím Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Žádný ze vzorků neměl hodnotou integrity RNA (RNA integrity number; RIN) ≥ 7 , RIN použitých vzorků se pohyboval v rozmezí 5 – 6, k čemuž bylo přihlédnuto při tvorbě knihoven.

Knihovny byly připraveny sadou KAPA RNA HypePrep Kit (Roche, Basilej, Švýcarsko) dle protokolu výrobce. Bylo použito 20 ng RNA. Kvůli poměrně vysoké degradaci vzorků byla při fragmentačním kroku zvolena teplota 85 °C po dobu 2 minut. Při amplifikačním kroku bylo kvůli nízké koncentraci vstupního materiálu zvoleno 14 cyklů. Při přípravě knihoven byly také použity adaptéry KAPA Dual-Indexed Adapter kit (Roche, Basilej, Švýcarsko), a to adaptéry s označením F1-F5. Knihovny byly sekvenovány na přístroji Illumina NextSeq 500 (Roche, Basilej, Švýcarsko) v centru CEITEC v Brně.

Na základě celogenomové sekvence druhu *T. benhamiae* (kmen CBS 112371) dostupné online (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse#!/eukaryotes/887/>) byla vytvořena indexová databáze, na kterou byla namapována data ze sekvenace RNA pomocí softwaru STAR verze 2.7.1 (Dobin et al., 2013). Analýza diferenciální genové exprese byla provedena v programu R verze 3.6.0 v balíčku DESeq2 (Love et al., 2014). V tomto balíčku byla data normalizována, byla vypočtena míra velikosti účinku a standardní odchylka a byl proveden Wald test a Benjamini-Hochberg korekce pro odstranění falešně pozitivních výsledků. Statisticky významně se lišící geny byly anotovány v databázích NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) a UniProt (<https://www.uniprot.org/>).

3.2.5. RT-qPCR

Pro účely této diplomové práce byly navrženy specifické primery pro kvantifikaci genů spojovaných s virulencí. Seznam těchto genů a navržených primerů je v tabulce číslo 6. Pouze pro gen ARB_00701 byly použity primery publikované v (Staib et al., 2010), protože se pro tento gen nepodařilo navrhnout primery netvořící dimery.

Byly také navrženy primery pro housekeeping geny, nezbytné pro normalizaci dat. Vybrány byly geny již publikované jako vhodné referenční geny pro studium genové exprese dermatofytů (Ciesielska et al., 2019; Ciesielska and Staczek, 2018; Jacob et al., 2012). Zároveň byly otestovány publikované primery pro referenční geny použité pro analýzu genové exprese blízce příbuzného druhu *T. rubrum* (Zaugg et al., 2009). Seznam potenciálních referenčních genů a navržených primerů je v tabulce číslo 7.

Primery byly navrženy pomocí nástroje Primer – BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) tak, aby alespoň jeden primer z páru nasedal do exon-exon oblasti, což zabraňuje kvantifikaci genomické DNA a tím pádem

zkreslení výsledků. U navržených primerů byla pomocí nástroje OligoAnalyzer (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>) zkontrolována tvorba homodimerů, heterodimerů a vlásenek. Pro analýzu byly zvoleny pouze ty primery, jejichž ΔG nemělo hodnotu nižší, než -7 J v případě dimerů a -4 J v případě vlásenek.

Reverzní transkripce byla provedena pomocí LunaScript RT SuperMix Kit (New England Biolabs, Ipswich, USA). Reakční směs obsahovala 4 μ l LunaScript RT SuperMix (5X) a různý objem RNA tak, aby bylo přepisováno vždy 0,5 μ g RNA. Směs byla doplněna PCR vodou do celkového objemu 20 μ l. Také byla vytvořena kontrola bez templátu obsahující 4 μ l LunaScript RT SuperMix (5X) a 16 μ l PCR vody. Reakce byla provedena v přístroji MasterCycler (Eppendorf, Hamburk, Německo) a zahrnovala následující kroky:

- Nasedání primerů: 25 °C po dobu 2 minut
- Syntéza cDNA: 55 °C po dobu 10 minut
- Inaktivace teplem: 95 °C po dobu 1 minuty

Poté byl vytvořen směsný vzorek cDNA obsahující směs tří nejkvalitnějších ze čtyř celkově izolovaných vzorků RNA. Smíšená cDNA byla až do analýzy uskladněna při -35 °C.

Navržené primery byly testovány na směsném vzorku cDNA obsahujícím cDNA typových kmenů ze všech populací a z obou kultivačních podmínek ve stejném poměru. Reakce obsahovala 10 μ l Luna Universal qPCR Mix, 0,5 μ l forward primeru, 0,5 μ l reverse primeru, a cDNA ředěnou v poměrech 1:10, 1:50, 1:250, 1:1250, 1:6250, přičemž první ředění obsahovalo 2 μ l cDNA a 7 μ l PCR vody. Všechny reakce proběhly v duplikátu a byly doplněny kontrolou bez templátu obsahující 2 μ l kontroly a 7 μ l PCR vody. Reakce probíhala za podmínek:

- Iniciální denaturace: 95 °C po dobu 60 sekund
- Elongace (39 cyklů): 95 °C po dobu 15 sekund a 60 °C po dobu 30 sekund
- Inaktivace: 95 °C po dobu 60 sekund
- Ochlazení: 54 °C po dobu 60 sekund
- Analýza křivky tání: zvyšování teploty z 54 °C o 0,5 °C za 10 sekund až do 95 °C
- Finální ochlazení na 25 °C po dobu 60 sekund

Analýza RT-qPCR byla provedena za využití Luna Universal qPCR Master mix (New England Biolabs, Ipswich, USA), reakce obsahovala 10 μ l Luna Universal qPCR Mix, 0,5 μ l forward primeru, 0,5 μ l reverse primeru, 2 μ l cDNA a 7 μ l PCR vody. Reakce byla vždy

provedena v duplikátu a byla doplněna kontrolní reakcí bez templátu. Podmínky reakce byly následující:

- Iniciální denaturace: 95 °C po dobu 60 sekund
- Elongace (39 cyklů): 95 °C po dobu 15 sekund a 60 °C po dobu 30 sekund
- Inaktivace: 95 °C po dobu 60 sekund
- Ochlazení: 54 °C po dobu 60 sekund
- Analýza křivky tání: zvyšování teploty z 54 °C o 0,5 °C za 10 sekund až do 95 °C
- Finální ochlazení na 25 °C po dobu 60 sekund

Všechny RT-qPCR reakce byly provedeny v 96 jamkových destičkách v přístroji CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA). Data byla vizualizována v softwaru Bio-Rad CFX Manager 3.1 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA). Z tohoto softwaru byly vyexportovány hodnoty Ct (prahového cyklu), a standardní kalibrační křivky vyjadřující účinnost reakce. Z hodnot Ct byl vytvořen aritmetický průměr, byla vypočítána směrodatná odchylka a střední chyba průměru. Analýza relativní genové exprese (ΔCt) jednotlivých genů byla provedena podle vzorce:

$$\Delta Ct = \text{průměr Ct studovaného genu} - \text{průměr Ct referenčního genu}$$

Byla provedena také $2^{-\Delta\Delta Ct}$ analýza míry velikosti účinku (fold change) porovnávající hodnoty naměřené v normálních (kultivace v tekutých médiích) a experimentálních (kultivace na myších kožních explantátech) podmínkách. Statistické analýzy byly provedeny v programu PAST verze 3.22 (Hammer et al., 2001). Normalita rozložení dat byla ověřena Shapiro-Wilk testem. Na základě ΔCt dat jednotlivých podmínek byla vytvořena shluková analýza UPGMA a analýza hlavních komponent (PCA) a byl proveden Kruskal-Wallis test. Analýza stability referenčních genů testovaných na cDNA kmenů IHEM 25742, IHEM 17701, ME 192/12 a IHEM 4710 (z obou podmínek kultivace) byla provedena pomocí internetového nástroje RefFinder (Xie et al., 2012) využívajícího nástroje BestKeeper (Pfaffl et al., 2004), NormFinder (Andersen et al., 2004) a Genorm (Bustin et al., 2009).

Tabulka 6: Sekvence primerů pro RT-qPCR analýzu potenciálních genů virulence

Kód genu	Produkt	Zkratka	Funkce	Primer forward	Primer reverse	Tm F/R* [°C]	Exon-exon spoj (č. intronu)	Délka produktu [nt]
ARB_00701	Subtilisin 3	<i>sub3</i>	proteolýza	CATGCTTGCCCAGGG TGTTAG	CCTGGGTTGCGGATA ACG	_**	_**	_**
ARB_05085	Metaloproteáza 3	<i>mep3</i>	proteolýza	GCTCTTGACTTATGTC GATGCCC	CAGGCGAAGACCTT GTACTCAG	62,16/61,36	2	90
ARB_06975	Hydrofobin	<i>hypA</i>	adherence	CCCAATCCTCGACAA CATCAACC	GCGTTGACGAGACC AACCTG	62,38/62,24	2	168
ARB_07991	Protein s fasciclinovou doménou	<i>fdp</i>	adherence	TAAAGCCTTCGACAA GTTGGGA	GAAGCAGAGTCGGA AGATGTATTT	60,42/59,18	2	197
ARB_04645	Kataláza EasC	<i>easC</i>	syntéza sek. metabolitů	CATACGGAGAATTTG AGGTGACTG	TGAGAATCGAGTAA CACATTGCGTC	59,83/61,81	1	101
ARB_07994	Polyketid- syntáza konidiálního pigmentu PksP	<i>pksP</i>	syntéza sek. metabolitů	TACGATAAATCTGGA GAGCCAACG	TCTAACAGCTTGAGC CTAGACCG	60,90/62,44	4	83

* *Tm F/R* = teploty tání forward primeru a reverse primeru vypočítané programem Primer-BLAST

** publikováno v (Staib et al., 2010)

Tabulka 7: Sekvence primerů pro potenciální referenční geny

Kód genu	Gen	Zkratka	Primer forward	Primer reverse	Zdroj	T _m F/R* [°C]	Exon-exon spoj (č. intronu)	Délka produktu [nt]
TrMZG10ACO	Chitin syntáza	<i>CHS</i>	CGAAGTCTCCGGCTAC TCGTAT	CCGGGAAGCGG AGTATCC	(Zaugg et al., 2009)	-	-	-
TrMZC10ACH	ADP ribosilační faktor	<i>ARF</i>	CAGAGAAGAGTTGCA AAAGATGCT	TGCTTGTTGGCG AAAACGA	(Zaugg et al., 2009)	-	-	-
ARB_00512	Psm1 podjednotka kohesinu	<i>psm1</i>	ACTTTGAAGACTCTCG CAAACGC	CAATATCCAGG TATGCTTTCCCG C	Tato práce	62,37/62,46	2	183
ARB_04092	Beta aktin	<i>bact</i>	TACGGAAACATTGTCA TGTCTGGTG	AGACGGAGTAT TTACGCTCTGGA	Tato práce	61,87/61,51	1	139
ARB_06116	DNA dependentní RNA polymeráza II	<i>rpb2</i>	GTTGGAAATGCTCAA GCCCTGTA	TTGGTTCATGCT CATTGGTGAGG	Tato práce	61,94/61,95	0	109
ARB_02486	Chitin syntáza	<i>chits</i>	CTTGCTTCCTACAATA TCTCCTCCT	GGTTTATCGTCT CCCTTGGTTCC	Tato práce	60,31/61,67	3	112
ARB_03667	ADP ribosilační faktor	<i>adp-rf</i>	GAAGATGCTCAACGA GGACGAAC	TAGATTGGATGT ACCAGGCACG	Tato práce	62,20/60,55	3	149

* T_m F/R = teploty tání forward primeru a reverse primeru vypočítané programem Primer-BLAST

3.3. Volatilní metabolity

3.3.1. Kultivace

Vybrané kmeny komplexu *T. benhamiae* (tabulka číslo 1), byly předkultivovány v tekutém Czapekově médiu s přidavkem látek esenciálních pro růst dermatofytů a ovčí vlnou (tabulka číslo 8). V tomto médiu byly kmeny kultivovány za stálého třepání při 37 °C po dobu 8 dní v 50ml plastových zkumavkách s kónickým dnem (tzv. falkonkách). Předkultivace probíhala pouze v jedné paralele pro každý kmen. Po osmi dnech byly třepáním v ruce po dobu 30 vteřin z prorostlé ovčí vlny do okolního média uvolněny houbové elementy. Z okolního média byl následně odebrán 1 ml tekutiny, která byla použita k inokulaci skleněných vialek s médiem připravených následujícím způsobem: do skleněný vialek o objemu 40 ml určených pro headspace analýzu bylo vloženo 0,1 g sterilní ovčí vlny, 0,2 g agaru a 2 ml destilované vody. Vialky byly opatřeny víčkem se septem, a sterilizovány v autoklávu při 121 °C po dobu 20 minut. V těchto vialkách byly kmeny kultivovány po dobu 14 dní při teplotě 30 °C. Vzorky byly připravovány vždy v triplikátu a jako kontrola byly požitý vialky připravené stejným způsobem, ale s 1 ml sterilního předkultivačního média místo inokula.

Tabulka 8: Složení předkultivačního média pro analýzu GC-MS

Složka	g / 30 ml H ₂ O
Czapek-Dox broth*	1,0
Sterilní ovčí vlna	0,1
Glycin*	0,003
Thiamin*	0,003

* (HiMedia, Bombaj, Indie)

3.3.2. GC-MS

Analýza volatilních metabolitů byla provedena metodou GC-MS, tedy plynové chromatografie spojené s hmotnostní spektrometrií. K analýze byly použity přístroje Varian 450-GC a 240-MS s hmotnostním detektorem typu iontová past (Varian, Walnut Creek, USA). Procedura měření byla automatizovaná, použit byl autosampler CombiPal (CTC Analytics AG, Zwingen, Švýcarsko) disponující držákem absorpčních vláken a nahřívacím bločkem sloužícím k derivatizaci a extrakci derivovaných látek. K ovládání autosampleru byl použit software MS Workstation 6.9.1. (Agilent Technologies, Santa Clara, USA).

Vzorky byly inkubovány při 40 °C po dobu 30 minut a zároveň třepány rychlostí 250 rpm. Poté bylo skrz septum do vzorků vloženo 65 µm dlouhé vlákno pro mikroextrakci tuhou fází (solid phase microextraction; SPME) potažené polydimethylsiloxanem/divinybenzenem (PDMS/DVB) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo), extrakce tímto vláknem trvala 30 minut. Poté bylo vlákno vloženo do injektoru kde po dobu 10 minut probíhala desorpce látek. Celková analýza jednoho vzorku trvala zhruba 85 minut. Jako nosná fáze pro GC-MS analýzu bylo použito hélium s konstantním průtokem 1 ml/min. Jako stacionární fáze byla k separaci látek použita kolona DB-5ms dlouhá 30 m, o průměru 0,25 mm a s tloušťkou filmu 0,25 µm (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Teplota injektoru vybaveného SPME linerem Topaz (Restek, Bellefonte, USA) byla nastavena na 250 °C. Zpoždění rozpouštědla bylo nastaveno na 1 minutu. Teplotní program byl následující:

- 40 °C, izotermálně po dobu 2 minut
- Zahřátí na 200 °C rychlostí 10 °C/min
- Zahřátí na 260 °C rychlostí 25 °C/min
- 260 °C, izotermálně po dobu 5 minut

Teplota hmotnostního spektrometru byla nastavena na hodnoty 220 °C pro iontovou past, 40 °C pro manifold a 280 °C pro transfer line. Látky byly sbírány v hmotnostním spektru 50–500 m/z.

Chromatogramy byly prohlíženy v programu MS Data Review, který je součástí již zmiňovaného MS Workstation. K procesování dat byla použita automatická metoda s tresholdem 10000 „countů“ v softwaru AMDIS verze 2.66 (NIST, Gaithersburg, USA). Vizualizace a statistická analýza dat byla provedena v programu Mass Profiler Professional verze 15.1 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Nejprve byla zhodnocena kvalita dat, při které byly vyřazeny analyty, vyskytující se v méně než třech paralelních vzorcích. Poté byl proveden Shapiro-Wilk test normálního rozložení dat na hladině $p > 0,05$. Automaticky zpracované píky byly testovány jednosměrným testem ANOVA s hladinou významnosti $p < 0,05$. Do analýzy byly vybrány pouze píky, jejichž fold change byl oproti kontrole > 16 . Na těchto látkách byla provedena shluková analýza, která byla spolu s těmito látkami vizualizována v tzv. heatmapě. Přibližná identita potenciálně zajímavých látek byla určena podle retenčního času píku, k němuž bylo v programu MS Data Review hmotnostní spektrum. To bylo v tomtéž programu srovnáno s údaji v knihovně NIST 2014 (NIST/EPA/NIH, 2014), čímž byla získána přibližná struktura dané látky.

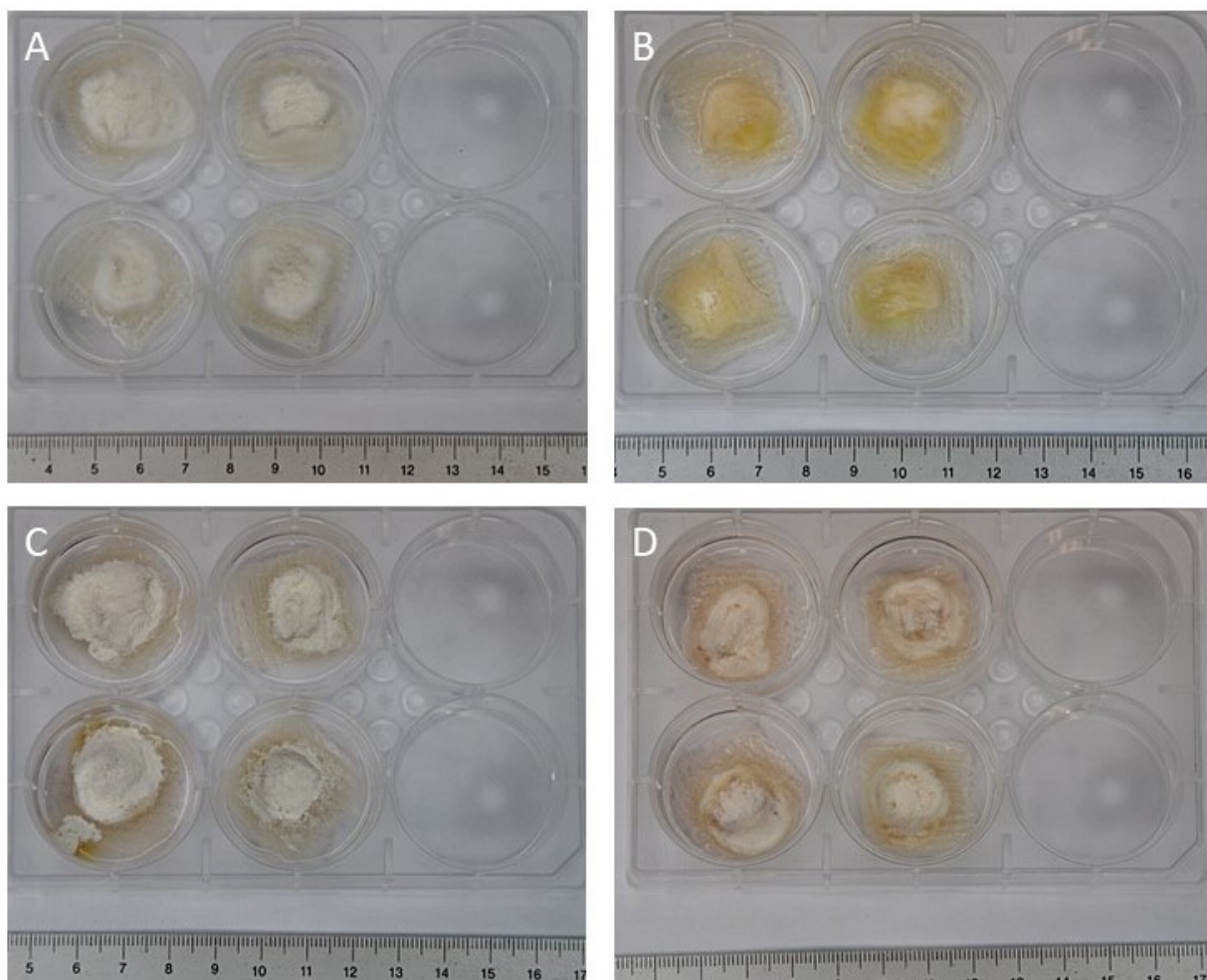
4. VÝSLEDKY

4.1. Myší kožní modely

V této diplomové práci byl optimalizován protokol pro úspěšnou tvorbu a uchování *ex vivo* kožních štěpů pro kultivaci dermatofytů. V rámci tvorby protokolu bylo vyzkoušeno několik přístupů dezinfekce kožních štěpů. Vzorky ošetřené pouze ethanolem vykazovaly již do třetího dne vysokou úroveň bakteriální i mykotické kontaminace, kterou prokázalo zakalení nálevu i mikroskopická kontrola. U vzorků ošetřených chlornanem sodným ke kontaminaci nedošlo, došlo však k reakci s antibiotiky obsaženými v kultivačním roztoku, která se projevila ostře žluto-zeleným zbarvením roztoku (příloha číslo 1). U vzorků ošetřených benzalkonium bromidem nedošlo ani k mikrobiální kontaminaci, ani k viditelné reakci s kultivačním roztokem.

Růst dermatofytů na myších kožních explantátech byl u *T. benhamiae* var. *benhamiae*, *T. europaeum* i *T. japonicum* okem pozorovatelný již po dvou dnech od inokulace, zatímco růst *T. benhamiae* var. *luteum* začíná být viditelný až po čtyřech dnech. Po šesti dnech od inokulace byly explantáty s *T. benhamiae* var. *benhamiae*, *T. europaeum* i *T. japonicum* plně porostlé, bylo dokonce možné pozorovat růst některých jedinců mimo explantáty a výraznou sporulaci všech naočkovaných kmenů. Naopak *T. benhamiae* var. *luteum* začal plně kolonizovat kůži až po osmi dnech od inokulace a bylo možné pozorovat jen slabou nebo žádnou sporulaci. U všech studovaných kmenů však docházelo k silné produkci sekundárních metabolitů barevným spektrem odpovídajících zbarvení metabolitů vylučovaných při růstu na agarových médiích.

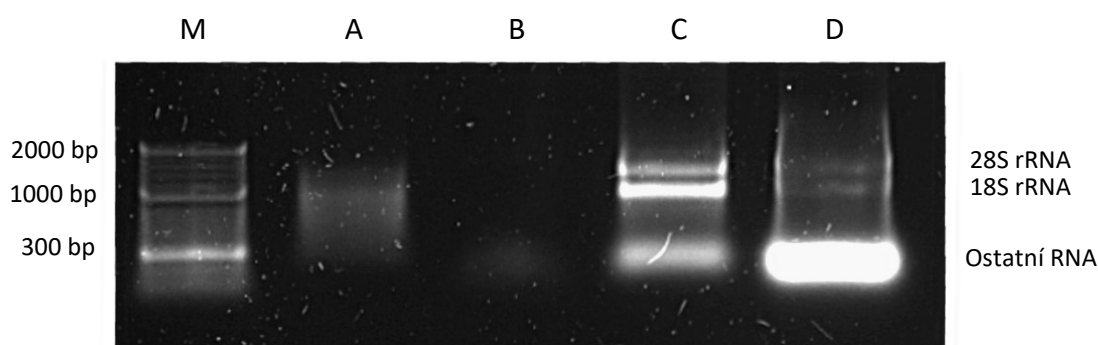
Z celkem 12 inokulovaných kmenů se inokulace zdařila jen na devíti z nich, tři zástupci na myších kožních explantátech vůbec nenarostly, jednalo se konkrétně o kmeny IHEM 25077 (*T. benhamiae* var. *luteum*), IHEM 20161 a IHEM 25062 (oba *T. europaeum*) zřejmě z důvodu špatné inokulace. Vzhledem k celostátním opatřením zavedeným kvůli epidemii koronaviru nového typu SARS-CoV-2 nebylo možné experiment zopakovat a chybějící data doplnit. Fotografie některých myších kožních explantátů po osmi dnech od kultivace jsou na obrázku číslo 5. Vytvořený *ex vivo* kožní model umožňoval kultivaci myších kožních štěpů až po dobu 20 dní bez viditelné degradace kůže či bakteriální kontaminace. Další fotografickou dokumentaci myších kožních explantátů lze najít v příloze číslo 2.



Obrázek 5: Kmeny komplexu *Trichophyton benhamiae* po osmi dnech na ex vivo kožních explantátech. *T. benhamiae* var. *benhamiae*, kmen USA 3366 (A); *T. benhamiae* var. *luteum*, kmen SK 1242/12 (B); *T. europaeum*, kmen ME 192/12 (C); *T. japonicum*, kmen NUBS 13002 (C).

4.2. Izolace a zpracování RNA

V rámci této diplomové práce bylo vyzkoušeno několik přístupů extrakce a izolace RNA ze vzorků kultivovaných v tekutých kulturách. Jako ukazatel úrovně degradace byla použita vizuální kontrola intenzity dvojitých proužků typických pro 28S a 18S podjednotky ribozomální RNA. Homogenizace skleněnými kuličkami (obr. č. 6; B, D) se ukázala jako nevhodná, RNA jí získaná měla velmi nízkou integritu a výtěžnost byla až desetkrát menší (0,01 – 0,05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) než u vzorků rozdrcených v tekutém dusíku (0,03 – 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) které byly i méně degradované (obr. č. 6; A, C). Vysokou degradaci vykazovala též RNA izolovaná pomocí NucleoSpin RNA Plant and Fungi (obr. č. 6; A, B), u které proužky značící přítomnost intaktní rRNA dokonce zcela chybí. Naopak v případě izolace látkou TRIzol jsou dobře viditelné (obr. č. 6; C, D).



Obrázek 6: Elektroforetogram RNA získané různým způsobem; *M* = marker, *A* = komerční sada + tekutý dusík, *B* = komerční sada + kuličky, *C* = TRIzol + tekutý dusík, *D* = TRIzol + kuličky

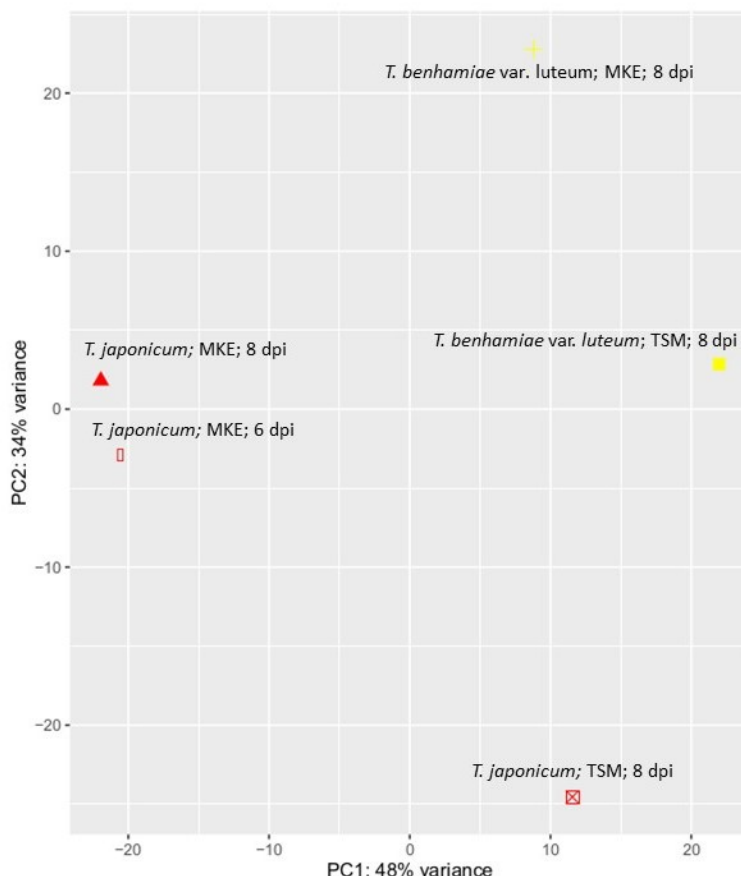
4.3. RNAseq

Výsledky Wald testu porovnávajícího *T. japonicum* zastoupený kmenem NUBS 13002 a *T. benhamiae* var. *luteum* zastoupený kmenem IHEM 25742 (bez ohledu na kultivační podmínky) ukázaly na 65 genů lišících se na hladině $p < 0,05$. Z těchto genů nebylo 41 v databázi NCBI anotováno, u některých z nich však bylo možné najít homologii se známými proteiny pomocí databáze UniProt. Anotované geny, jejichž genová exprese se statisticky lišila lze najít v tabulce číslo 9. Plný seznam obsahující i neanotované geny lze najít v příloze číslo 3.

Na základě všech statisticky významných dat byla provedena analýza hlavních komponent (PCA), porovnávající všech pět sekvenovaných vzorků. I tato analýza ukázala, že se od sebe oba kmeny významně liší. Navíc také ukázala, že u obou zástupců je genová exprese významně odlišná při kultivaci v *in vivo* a *ex vivo* podmínkách a také že se genová exprese zástupce *T. japonicum* kultivovaného *in vitro* v tekutém médiu v čase (zde měřen časový rozestup dvou dní) téměř neliší. Výsledek analýzy PCA je na obrázku číslo 7.

Tabulka 9: Výstup z analýzy dat získaných sekvenací mRNA knihoven provedené v programu R v balíčku DESeq2. Jednotlivé geny byly srovnány s databází NCBI. Porovnávány byly kmeny NUBS 13002 patřící do *T. japonicum* (vzorky 8 dpi na TSM + 8 dpi na MKE) versus IHEM 25743 patřící do *T. benhamiae* var. *luteum* (vzorky 8 dpi na TSM + 8 dpi na MKE). Záporné hodnoty získané Wald statistikou značí up-regulaci u *T. benhamiae* var. *luteum*, kladné up-regulaci u *T. japonicum*; TSM = Tekuté Sabouraudovo médium, MKE = myši kožní explantáty, dpi = dní po inokulaci

Gen	Míra velikosti účinku (log2 fold change)	Wald statistika	Wald test (p hodnota)	p hodnota upravená Benjamini-Hochberg korekcí	Anotace
ARB_06975	-12,93	-7.43	1,08E-13	2,79E-10	hydrofobin, potenciální
ARB_07538	7,04	5.52	3,35E-08	2,16E-05	monooxygenáza vážící FAD, potenciální
ARB_04859	5,24	4.75	2,06E-06	0,000665092	oxalate dekarboxyláza, potenciální
ARB_07994	6,81	4.42	9,92E-06	0,002131702	polyketid-syntáza konidiálního pigmentu PksP/Alb1
ARB_07534	6,68	4.40	1,09E-05	0,002164306	polyketid-syntáza podobná LovB, potenciální
ARB_02932	6,91	4.20	2,65E-05	0,003589042	protein s doménou RTA1, potenciální
ARB_03861	5,13	4.10	4,18E-05	0,004509093	glutathione S-transferáza podobná Ure2, potenciální
ARB_06429	-8,83	-4.08	4,55E-05	0,004509093	O-methyltransferáza
ARB_07989	6,99	4.08	4,47E-05	0,004509093	O-methyltransferáza, potenciální
ARB_06173	4,71	4.04	5,41E-05	0,004873781	alkohol dehydrogenáza obsahující zinek, potenciální
ARB_07992	6,88	3.92	8,93E-05	0,007428978	protein s dehydrogenázou/reduktázou krátkých řetězců
ARB_01724	-5,27	-3.80	0,000142683	0,010217699	ko-chaperon Sba1 chaperonu Hsp90, potenciální
ARB_01072	6,40	3.71	0,000206945	0,013847169	karboxyesteráza, potenciální
ARB_03514	-7,19	-3.63	0,00027885	0,017533574	chitináza III. třídy ChiA2
ARB_05391	3,70	3.61	0,000307758	0,018890488	transportér peptidů z rodiny PTR, potenciální
ARB_01940	4,03	3.60	0,00031624	0,018959696	homogentisát-1,2-dioxygenáza, potenciální
ARB_07991	6,49	3.47	0,000522028	0,028783718	protein s fasciclinovou doménou
ARB_04467	-3,63	-3.44	0,000582195	0,029876008	glukanáza, potenciální
ARB_06241	-6,20	-3.44	0,000590757	0,029876008	opsin, potenciální
ARB_01248	4,06	3.35	0,000800954	0,0370185	alkohol dehydrogenáza obsahující zinek, potenciální
ARB_03395	-4,27	-3.35	0,000804126	0,0370185	protein Aos23, potenciální
ARB_07818	-3,27	-3.36	0,000792001	0,0370185	monooxygenáza cytochromu P450, potenciální
ARB_04058	-4,17	-3.23	0,001227318	0,049318659	DNA opravný a transkripční faktor Ada, potenciální
ARB_07483	-2,95	-3.23	0,001243488	0,049318659	protein teplotního šoku Awh11, potenciální



Obrázek 7: PCA analýza dat z RNAseq porovnávající kmeny NUBS 13002 patřící do *T. japonicum* a IHEM 25742 patřící do *T. benhamiae* var. *luteum* rostoucí v různých podmínkách po různě dlouhou dobu; TSM = Tekuté Sabouraudovo médium, MKE = myši kožní explantáty, dpi = dny po inokulaci.

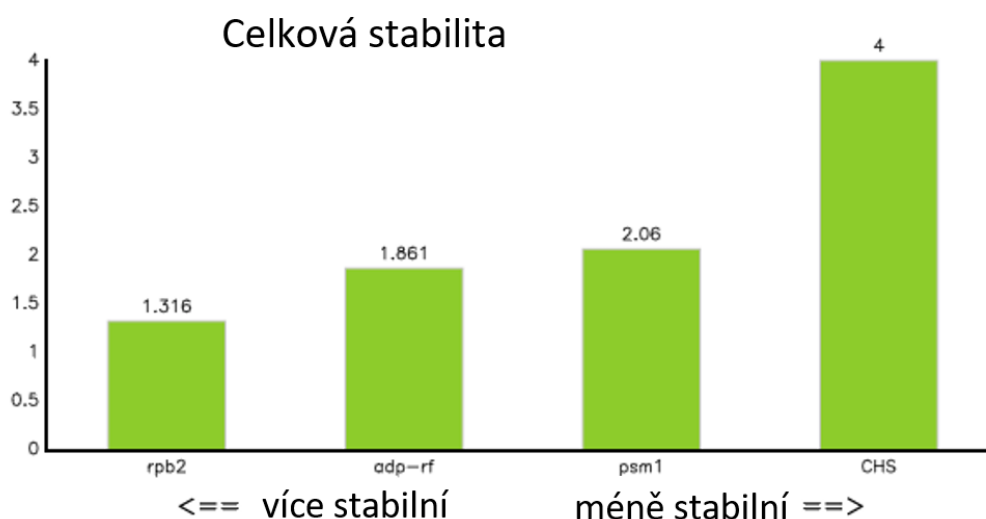
4.4. RT-qPCR analýza

4.4.1. Stabilita referenčních genů

Ze sedmi testovaných primerů pro referenční geny tři páry tvořily za daných reakčních podmínek dimery, konkrétně se jednalo o primery pro geny ADP ribosilační faktor *ARF* (tento pár primerů byl již publikován ve studii (Zaugg et al., 2009)), beta aktin *bact* a chitin syntázu *chits*. Všechny ostatní primery dimery netvořily. Hodnoty rozmezí prahového cyklu (*Ct*), účinnosti reakce a standardní kalibrační křivky potenciálních referenčních genů jsou uvedeny v tabulce číslo 10. Analýzou stability nástrojem RefFinder (Xie et al., 2012) byly jako referenční vybrány geny *rpb2* a *adp-rf*. Výsledek této analýzy je na obrázku číslo 8. Oba vybrané geny již byly popsány jako vhodné referenční geny pro studium genové exprese jiných druhů dermatofytů (Ciesielska et al., 2019; Jacob et al., 2012). Detailní výsledky jednotlivých testů stability referenčních genů lze najít v příloze číslo 4.

Tabulka 10: Hodnoty rozmezí prahového cyklu (Ct), účinnost reakce a koeficient determinace vybraných potenciálních referenčních genů testovaných na směsném vzorku typových kmenů *T.benhamiae* při růstu v tekutém Sabouraudově médiu a na myších kožních explantátech.

Studovaný gen	Průměrný Ct	Účinnost reakce (%)	Koeficient determinace R ²
CHS	19,9 – 29,1	96,7	0,996
psm1	19,9 – 29,1	95,1	0,999
rpb2	20,6 – 30,1	96,5	0,999
adp-rf	16,4 – 25, 8	99,7	1,000



Obrázek 8: Výsledek analýzy stability referenčních genů *rpb2*, *adp-rf*, *psm1* a *CHS* testovaných na směsném vzorku typových kmenů *T.benhamiae* při růstu v tekutém Sabouraudově médiu a na myších kožních explantátech provedené nástrojem RefFinder. Jedná se o souhrnnou analýzu z dílčích metod Δ Ct, BestKeeper, normFinder a Genorm. Geny jsou seřazeny od nejstabilnějších po nejméně stabilní v daných testovaných podmínkách.

4.4.2. Relativní genová exprese

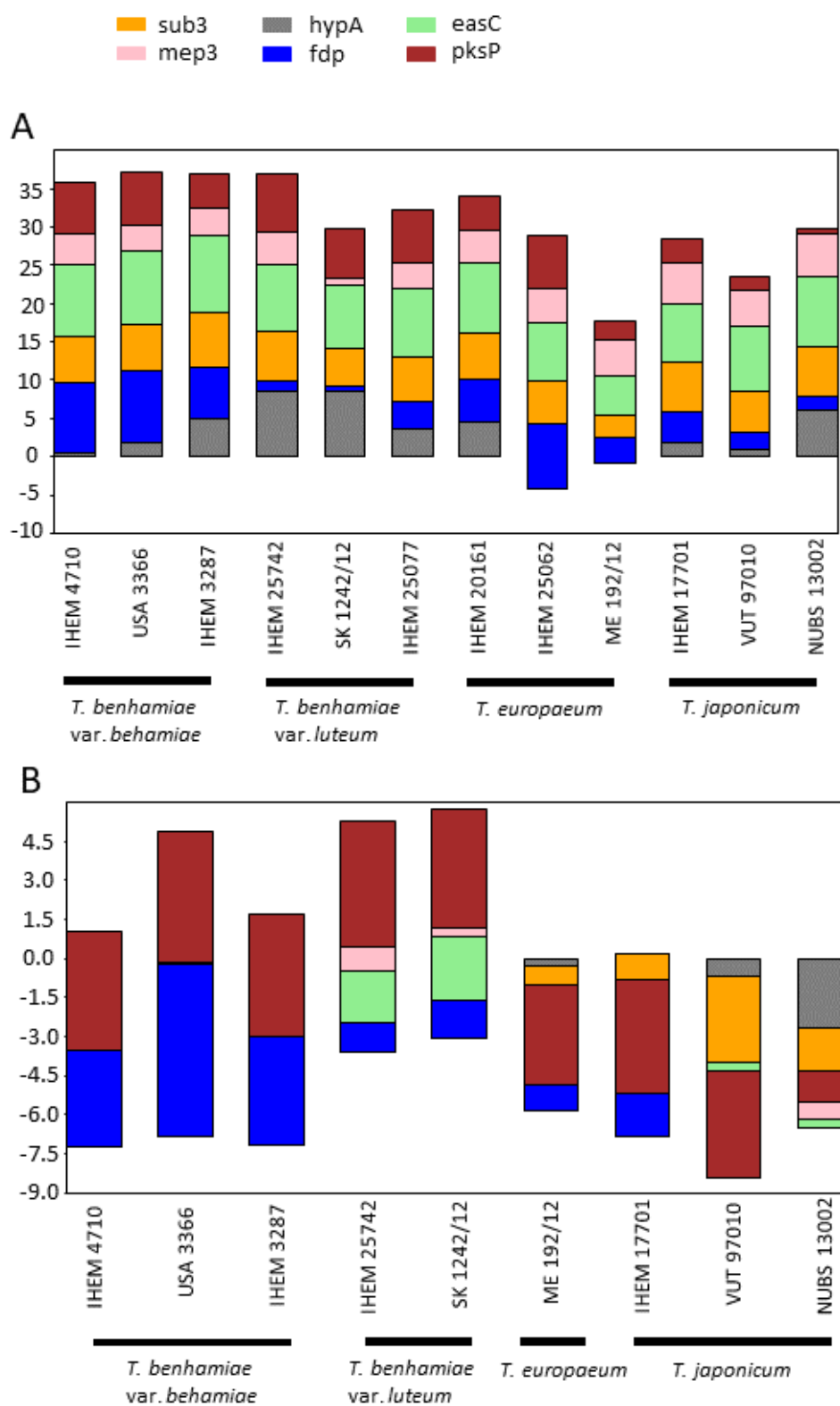
Hodnoty rozmezí prahového cyklu (Ct), účinnosti reakce a koeficient determinace všech studovaných genů jsou uvedeny v tabulce číslo 11. Hodnoty relativní genové exprese (Δ Ct) pro jednotlivé kmeny získané z těchto dat je vizualizována na obrázku číslo 9, hodnoty Δ Ct pro jednotlivé kmeny v různých kultivačních podmínkách jsou v tabulkách 12 a 13. Hodnoty míry velikosti účinku ($2^{-\Delta\Delta$ Ct) pro jednotlivé geny jsou v tabulce číslo 14. Analýza relativní genové exprese Δ Ct zahrnovala analýzu normality získaných dat Shapiro-Wilk testem. Výsledky shlukové analýzy UPGMA (obrázek číslo 10) a PCA (obrázek číslo 11) ani v jednom

případě neodpovídaly fylogenezi studovaných kmenů. Obě ale vyhodnotily kmeny IHEM 25742 a SK 1242/12 patřící do epidemické populace jako výrazně se lišící od ostatních kmenů.

Při porovnání diferenciální genové exprese jednotlivých populací Kruskal-Wallis testem se relativní genová exprese jednotlivých populací lišila jen zřídka. Obzvláště exprese genů pro sekretované proteázy byla napříč kmeny poměrně uniformní. Zatímco exprese genu pro Sub 3 se signifikantně nelišila mezi populacemi rostoucími v tekutém Sabouraudově médiu ($p = 0,51$), ani na myších kožních explantátech ($p = 0,34$), rozdíl v expresi genu pro Mep 3 byl při růstu v tekutém médiu signifikantní ($p = 0,03$), nikoliv však na myších kožních explantátech ($p = 0,18$).

Geny pro potenciální adheziny Hyp A a protein s fasciclinovou doménou, nejrozdílnější studované faktory dle PCA, nemají při růstu v tekutém Sabouraudově médiu mezi populacemi významně odlišnou míru exprese v případě prvního ($p = 0,19$) ani druhého jmenovaného faktoru ($p = 0,05$). Exprese HypA je při růstu na myších kožních explantátech výrazně potlačena a populace se v ní mezi sebou liší ($p = 0,04$), což platí i pro protein s fasciclinovou doménou ($p = 0,03$). Exprese genu pro tento protein se navíc téměř nelišila mezi kultivačními podmínkami, jeho průměrná míra velikosti účinku je nejnižší ze všech sledovaných genů.

Také u genů pro enzymy spojené s produkcí sekundárních metabolitů byla pozorována nižší exprese při růstu na myších kožních explantátech než v tekutém Sabouraudově médiu. Exprese EasC se při růstu v tekutém Sabouraudově médiu mezi populacemi nelišila ($p = 0,08$), stejně jako exprese PksP ($p = 0,06$). Při růstu na myších kožních explantátech byla exprese EasC nižší u všech sledovaných kmenů, nejvíce byl tento gen exprimován u zástupců epidemické populace, kteří také spolu s kmenem ME 192/12 vykazovali nejnižší míru velikosti účinku v tomto genu. Populace se však mezi sebou nelišily ($p = 0,28$). Exprese PksP byla v těchto podmínkách až na kmen NUBS 13002 napříč kmeny velmi podobná, ani zde nedosahovala signifikantních rozdílů ($p = 0,11$).



Obrázek 9: Vizualizace relativní genové exprese ΔC_t (osa y) potenciálních genů virulence kmenů komplexu *T. benhamiae* kultivovaných v tekutém Sabouraudově médiu (A) a na myších kožních explantátech (B). Grafy byly vytvořeny v programu PAST a upraveny.

Tabulka 11: Hodnoty rozmezí prahového cyklu (Ct), účinnost reakce a koeficient determinace vybraných potenciálních genů virulence testovaných na směsném vzorku typových kmenů *T. benhamiae* při růstu v tekutém Sabouraudově médiu a na myších kožních explantátech.

Studovaný gen	Rozmezí Ct	Účinnost reakce (%)	Koeficient determinace R ²
<i>sub3</i>	24,3 – 34,3	96,2	0,992
<i>mep3</i>	22,6 – 32,4	93,4	0,996
<i>hypA</i>	20,6 – 30,7	90,8	0,998
<i>fdp</i>	21,1 – 30,6	97,9	0,996
<i>easC</i>	26,3 – 36,3	98,5	0,980
<i>pksP</i>	21,2 – 28,4	98,6	0,997

Tabulka 12: Hodnoty relativní genové exprese (Δ Ct) vybraných potenciálních genů virulence kmenů *T. benhamiae* při růstu v tekutém Sabouraudově médiu.

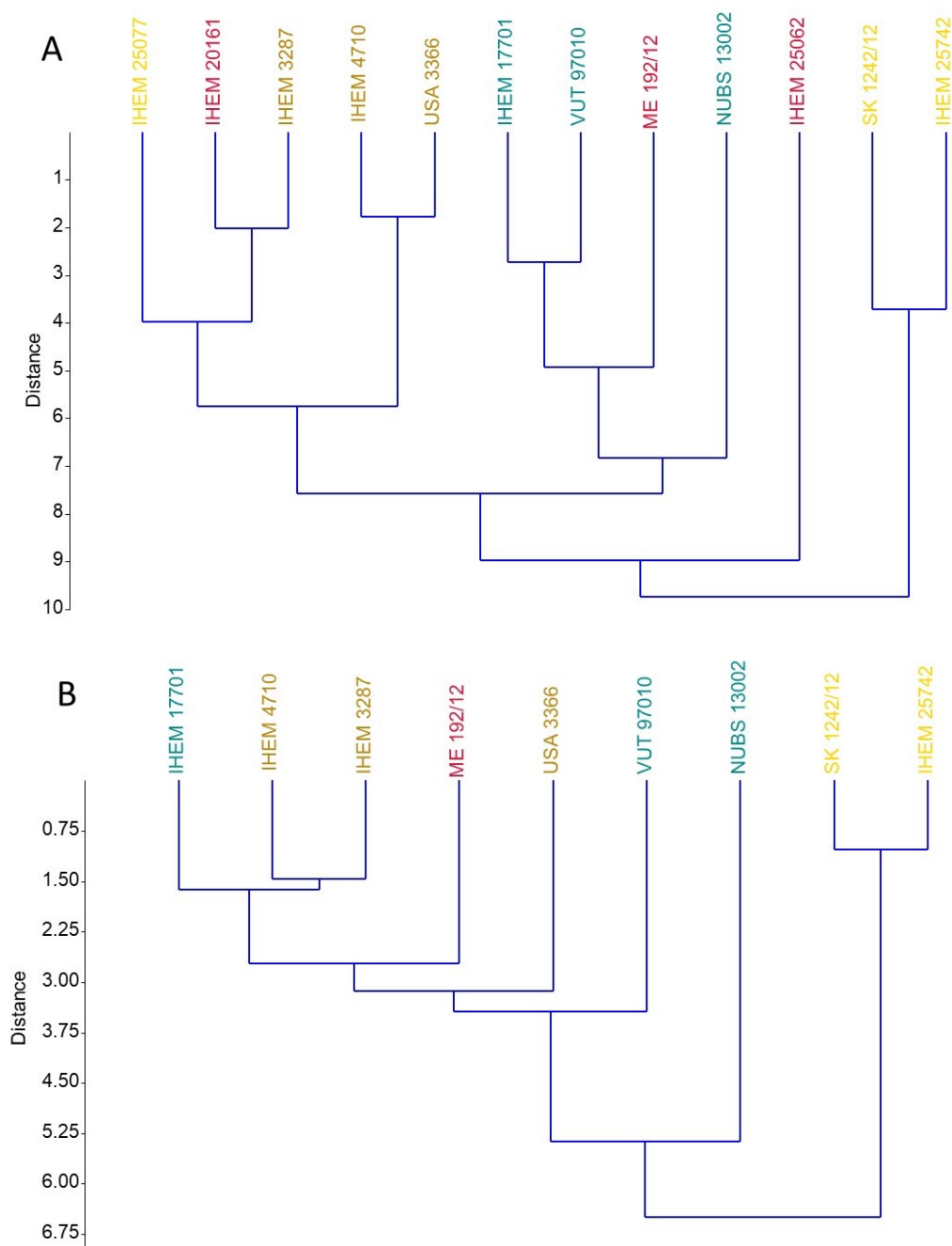
ΔCt: Tekuté Sabouradovo médium						
	<i>sub3</i>	<i>mep3</i>	<i>hypA</i>	<i>fdp</i>	<i>easC</i>	<i>pksP</i>
IHEM 25742	6,37	4,08	8,53	1,39	8,85	7,62
SK 1242/12	5,05	0,98	8,53	0,63	8,07	6,53
IHEM 25077	5,78	3,33	3,53	3,78	8,86	6,97
IHEM 17701	6,32	5,29	1,79	4,14	7,75	3,09
VUT 97010	5,46	4,80	0,86	2,33	8,35	1,72
NUBS 13002	6,49	5,55	6,11	1,66	9,19	0,77
IHEM 20161	6,23	4,26	4,51	5,50	9,05	4,38
IHEM 25062	5,55	4,50	-4,13	8,53	7,61	6,93
ME 192/12	3,03	4,83	-0,90	3,37	4,98	2,39
IHEM 4710	6,00	4,04	0,40	9,31	9,30	6,81
USA 3366	6,05	3,22	1,91	9,24	9,68	7,00
IHEM 3287	7,05	3,56	5,01	6,70	10,14	4,46

Tabulka 13: Hodnoty relativní genové exprese (ΔCt) vybraných potenciálních genů virulence kmenů *T. benhamiae* při růstu na myších kožních explantátech.

ΔCt: Myší kožní explantáty						
	<i>sub3</i>	<i>mep3</i>	<i>hypA</i>	<i>fdp</i>	<i>easC</i>	<i>pksP</i>
IHEM 25742	-1,61	0,91	-3,62	2,74	2,01	4,86
SK 1242/12	-1,67	0,34	-3,06	3,13	2,44	4,58
IHEM 25077	-	-	-	-	-	-
IHEM 17701	-4,03	-0,58	-6,87	7,03	-0,74	4,37
VUT 97010	-3,32	-2,11	-7,60	6,89	-2,30	4,13
NUBS 13002	-3,86	0,66	-6,31	3,64	0,38	1,19
IHEM 20161	-	-	-	-	-	-
IHEM 25062	-	-	-	-	-	-
ME 192/12	-4,52	-0,60	-5,84	5,58	0,50	3,86
IHEM 4710	-2,82	-0,98	-7,26	7,24	0,26	4,58
USA 3366	-1,12	-0,62	-6,87	7,78	0,69	5,00
IHEM 3287	-3,88	-0,34	-7,17	8,01	0,35	4,70

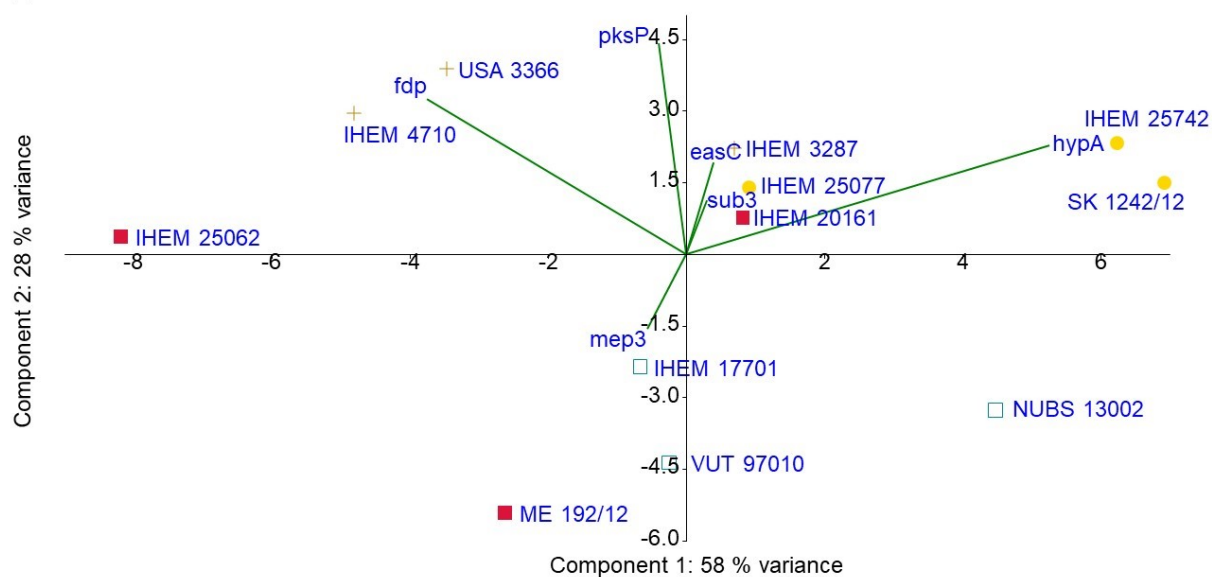
Tabulka 14: Hodnoty míry účinku ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) udávající změnu v genové expresi kmenů *T. benhamiae* rostoucích v tekutém Sabouraudově médiu versus na myších kožních explantátech ve vybraných sledovaných genech.

$2^{-\Delta\Delta Ct}$:						
	<i>sub3</i>	<i>mep3</i>	<i>hypA</i>	<i>fdp</i>	<i>easC</i>	<i>pksP</i>
IHEM 25742	252,35	9,03	4526,82	0,39	114,90	6,77
SK 1242/12	105,29	1,56	3089,65	0,18	49,46	3,87
IHEM 25077	-	-	-	-	-	-
IHEM 17701	1305,78	58,72	404,70	0,13	360,96	0,41
VUT 97010	437,29	120,05	351,51	0,04	1603,97	0,19
NUBS 13002	1306,50	29,78	5504,85	0,25	449,29	0,75
IHEM 20161	-	-	-	-	-	-
IHEM 25062	-	-	-	-	-	-
ME 192/12	187,93	42,93	30,68	0,22	22,30	0,36
IHEM 4710	451,16	32,39	202,60	4,21	527,31	4,72
USA 3366	143,31	14,20	438,99	2,75	509,54	3,99
IHEM 3287	1950,11	14,97	4622,11	0,39	884,88	0,85

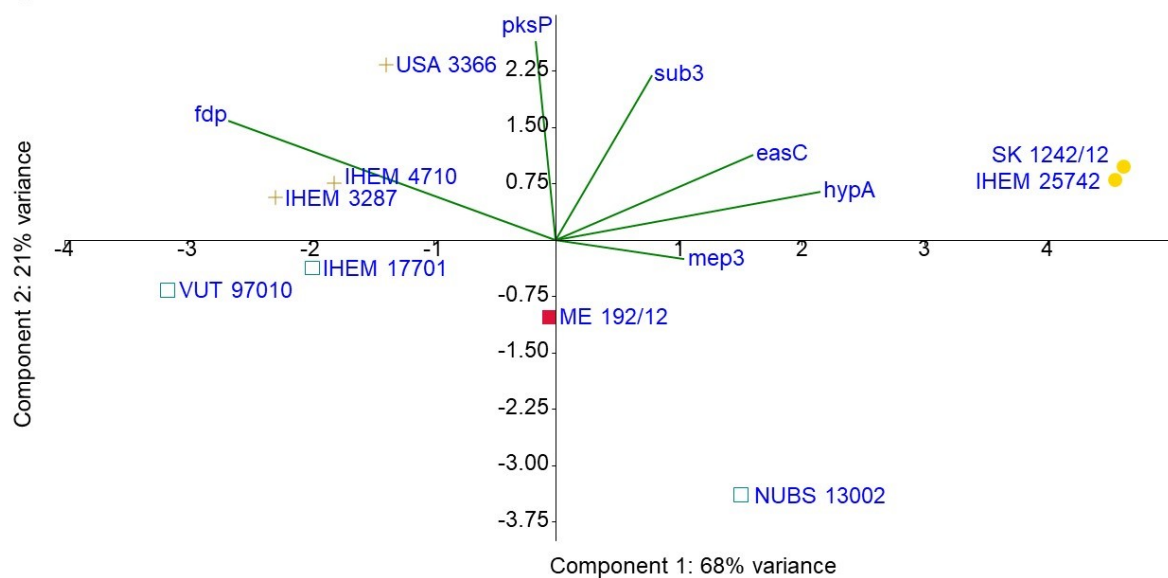


Obrázek 10: Shluková analýza UPGMA pro ΔC_t hodnoty kmenů *T. benhamiae* rostoucích v tekutém Sabouraudově médiu (A) a na myších kožních explantátech (B) po dobu 8 dní; hnědě jsou označeny kmeny populace *T. benhamiae* var. *benhamiae*, žlutě *T. benhamiae* var. *luteum*, červeně *T. europaeum* a zeleně *T. japonicum*. Analýza byla provedena v programu PAST.

A



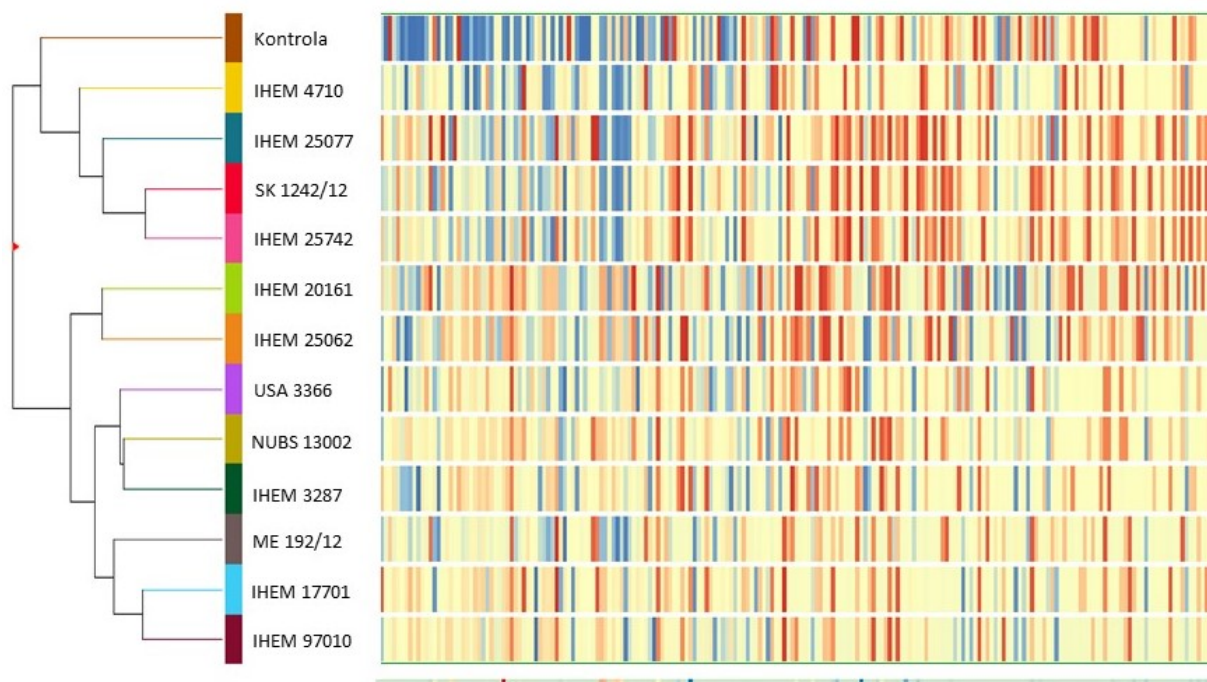
B



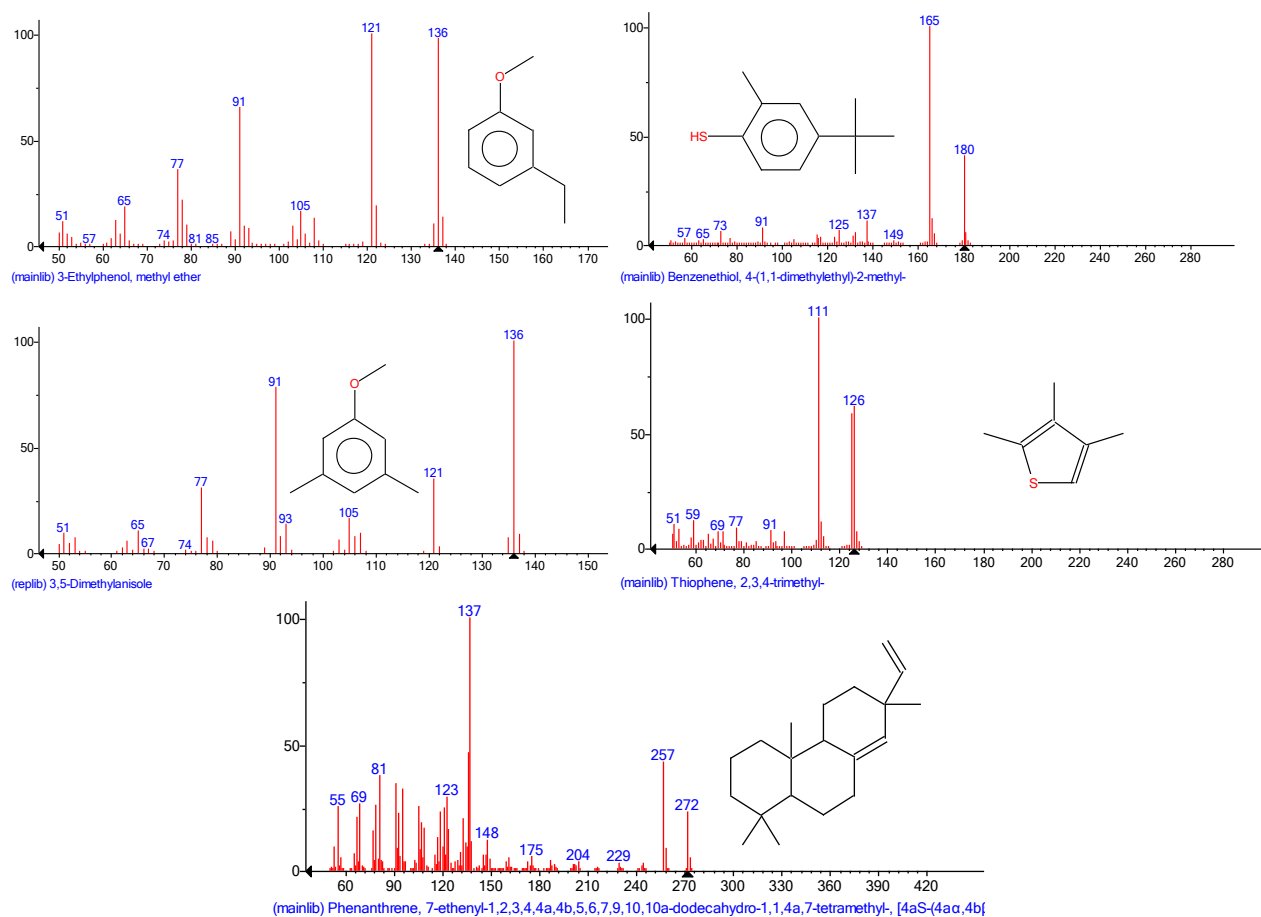
Obrázek 11: Analýza hlavních komponent PCA pro ΔCt hodnoty kmenů *T. benhamiae* rostoucích v tekutém Sabouraudově médiu (A) a na myších kožních explantátech (B) po dobu 8 dní; hnědě jsou označeny kmeny populace *T. benhamiae* var. *benhamiae*, žlutě *T. benhamiae* var. *luteum*, červeně *T. europaeum* a zeleně *T. japonicum*. Analýza byla provedena v programu PAST.

4.5. Volatilní metabolity

V této diplomové práci byla vyvinuta metodika kultivace vzorků pro analýzu volatilních metabolitů komplexu *T. benhamiae* metodou GC-MS. Všechny vzorky vykazovaly signifikantní rozdíly (ANOVA: $p < 0,05$), do shlukové analýzy byly zahrnuty píky mající fold change > 16 . Výsledky této analýzy jsou vizualizovány formou heatmapy na obrázku číslo 12. Spektra látek volatilních metabolitů analyzovaná v této diplomové práci nejsou druhově specifická a neodpovídají fylogenetickému dělení vytvořeném na základě polyfázického přístupu (Čmoková et al., v přípravě). Výjimku však tvoří kmeny epidemicky se šířící populace *T. benhamiae* var. *luteum*, které produkují spektrum látek odlišné od ostatních zástupců. Některé látky specifické pro tuto skupinu byly srovnány s knihovnou NIST 2014, na základě této identifikace jim byla přiřazena přibližná molekulární struktura, která je zobrazena na obrázku číslo 13. Všechny předběžně určené látky jsou aromatické, dvě z nich obsahují síru. Plný výstup této analýzy lze najít v přílohách 5 až 9.



Obrázek 12: Výstup z analýzy spekter volatilních organických látek kmenů *T. benhamiae* var. *benhamiae* (IHEM 4710, USA 3366, IHEM 3287), *T. benhamiae* var. *luteum* (IHEM 25742, SK 1242/12, IHEM 25077), *T. europaeum* (IHEM 20161, IHEM 25062, ME 192/12) a *T. japonicum* (IHEM 17701, VUT 97010, NUBS 13002). Do analýzy byly zahrnuty píky s fold change > 16 . Podobnost kmenů byla určena shlukovací analýzou UPGMA. Up-regulované píky jsou zobrazeny červeně, down-regulované modře; absence píku je zobrazena žlutě. Analýza byla provedena v programu Mass Profiler Professional.



Obrázek 13: Předběžně určená molekulární struktura volatilních organických látek specifických pro *T. benhamiae* var. *luteum*. Struktura byla získána srovnáním naměřeného hmotnostního spektra látky s hmotnostním spektrem látky identifikované knihovnou NIST 2014 v programu MS Data Review.

5. DISKUZE

5.1. Genová exprese

Analýza genové exprese přinesla perspektivní výsledky, byla ovšem zatížena i několika chybami, především špatnou volbou kmenů pro analýzu RNAseq. Jakožto zástupce neepidemické populace byl zvolen kmen NUBS 13002 (patřící do druhu *T. japonicum*), který se, jak se ukázalo z výsledků RT-qPCR, hodnotami výrazně odchyluje od všech ostatních studovaných kmenů tohoto druhu. Pro příští analýzy tedy bude nutné použít kmen jiný. I přesto tato pilotní analýza metodou RNAseq poukázala na několik potenciálních genů virulence zajímavých pro další výzkum. Některé z nich byly studovány též metodou RT-qPCR, která celkově potvrdila správnost výsledků předběžné RNAseq analýzy. Ze čtyř potenciálních faktorů virulence (Hyp A, protein s fasciclinovou doménou, kataláza EasC a polyketid-syntáza PksP) pouze u jednoho z nich, konkrétně u polyketid-syntázy PksP, výsledky RT-qPCR nepotvrdily výsledky sekvenace RNA (viz tabulky 9, 10 a 11). Vzhledem k pomalejšímu růstu *T. benhamiae* var. *luteum* (kolonie začaly být na myších kožních explantátech viditelné vždy cca o dva dny později než u ostatních populací) je zde také možnost, že jsou rozdíly v genové expresi do určité míry ovlivněny dobou růstu. Předběžná analýza RNAseq ale ukázala pouze malý rozdíl mezi expresí *T. japonicum* při růstu na myších explantátech u vzorku odebraného šest dní po inokulaci a osm dní po inokulaci (obrázek číslo 6), podobně jako další studie zabývající se stejnou problematikou (Staib et al., 2010; Tran et al., 2016). V příští studii bude i přesto nutné provést analýzu genové exprese u kmenů odebraných v různých časových intervalech po inokulaci, hlavně v dřívějších fázích růstu, aby byl získán komplexnější obraz o vývoji genové exprese potenciálních faktorů virulence v čase. Do příští studie bude také nutné zahrnout více biologických replikátů, aby mohlo být zajištěno ověření statistické významnosti získaných dat.

5.1.1. Myší kožní modely versus standardní kultivace

Jako kultivační média byly v této práci vybrány tekuté Sabouraudovo médium a *ex vivo* myší kožní explantáty. Pro přípravu *ex vivo* kožních explantátů byla jako modelové zvíře vybrána myš domácí (*Mus musculus*) hned z několika důvodů. Jedná se o zvíře výhodné pro snadnou dostupnost a manipulaci v běžných laboratorních podmínkách. Při použití jedinců vyražených a usmrcovaných v rámci běžné údržby chovů, jako v této diplomové práci, se jedná o cenově nenáročný a celkově etičtější přístup k využití laboratorních zvířat pro studium dermatofytóz, v porovnání s živými zvířaty. Pro studium dermatofytóz jsou navíc myši dobře zavedeným zvířecím modelem (Cambier et al., 2017). Pro tuto práci byl vybrán nejběžnější

inbrední druh laboratorních myší kmen BALB/c. Jeho výhodou pro tento experiment je světlé zbarvení kůže, na kterém je snadné pozorovat růst a zbarvení inokulovaných hub. Požadavky na pohlaví v této studii nehrály roli, jediným kritériem bylo stejné pohlaví všech jedinců. Samci byli zvoleni, protože právě oni jsou v rámci běžné údržby chovu usmrcováni nejčastěji. Věk nebyl specifikován, jediným kritériem bylo stejné stáří usmrcovaných jedinců. Posledním kritériem byla imunokompetence zvířat. Vzhledem k absenci testů viability kožních explantátů nelze vyloučit určitou, i když velmi nízkou, roli imunitní odpovědi myších kožních buněk na přítomnost patogenu a přítomnost imunokompetentních i imunosuprimovaných jedinců by mohla mít vliv na průběh experimentu. Díky své hostitelské specifitě je komplex *T. benhamiae*, který je běžným patogenem malých hlodavců ideálním kandidátem pro studium patogenity dermatofytů. Jako kontrolní podmínka k myším kožním explantátům bylo použito tekuté Sabouraudovo médium, které v publikovaných pracích (Staib et al., 2010; Tran et al., 2016) poskytovalo co nejodlišnější podmínky od kůže a kožních explantátů, navíc je vhodné pro sledování produkce sekretovaných proteáz v prostředí bez keratinu.

Výsledky analýzy transkriptomů *T. benhamiae* provedených v této studii do značné míry odpovídají výsledkům dříve publikovaných prací zabývajících se podobnou tematikou. Genová exprese kmenů rostoucích na myších kožních explantátech se výrazně liší od exprese kmenů rostoucích v tekutém médiu, podobně jako ve studiích porovnávajících růst *T. benhamiae* v různých tekutých médiích versus *in vivo* na živých morčatech (Staib et al., 2010; Tran et al., 2016). V těchto studiích bylo v *in vivo* podmínkách, stejně jako v *ex vivo* podmínkách v této diplomové práci, pozorováno snížení míry exprese genů pro sekretované proteázy. Vytvořený *ex vivo* model by tedy mohl být vhodným nástrojem k dalšímu zkoumání genové exprese dermatofytů. K tomuto závěru ostatně došla i další nedávná studie zabývající se přípravou *ex vivo* kožních explantátů za účelem kultivace *T. benhamiae* (Baumbach et al., 2020). I přesto bude nutné srovnání s *in vivo* kultivací kmenů *T. benhamiae* na živých laboratorních zvířatech. V těchto podmínkách bude možné sledovat vliv funkčního imunitního systému hostitele a u většiny zvířat přirozeně kyselého pH pokožky (Matousek and Campbell, 2002) na genovou expresi dermatofytů. Pokusy *in vivo* budou součástí disertační práce, která bude na tuto diplomovou práci přímo navazovat.

5.1.2. Analýza genové exprese

V této práci byla zvolena tzv. dvoukroková analýza RT-qPCR, při které se na rozdíl od analýzy jednokrokové provádí reverzní transkripce a samotná kvantifikace zvlášť. Tento přístup umožňuje případnou optimalizaci protokolu, zároveň je vytvářena zásobní

cDNA, která může být použita v příštích analýzách. Vzhledem k absenci některých dat může být statistická analýza genové exprese zatížena chybou, i přesto ale přinesly obě zvolené analýzy genové exprese zajímavé výsledky, ty jsou v následujících kapitolách diskutovány v kontextu procesů podílejících se na virulenci *T. benhamiae* i dermatofytů obecně.

5.1.3. Geny spojené s proteolýzou

Sekretované proteázy jsou nezbytné k rozkladu keratinu a přežití patogenu, zároveň ale aktivují imunitní systém hostitele a jejich produkce tedy musí být přísně regulována (Beauvais et al., 1997; Brouta et al., 2003; Woodfolk, 2005). Mezi jednotlivými studiemi porovnávajícími genovou expresi dermatofytů se informace o produkci sekretovaných proteáz liší. Důvodem může být například rozdílné pH při kultivačních podmínkách, dermatofyty totiž disponují sofistikovaným mechanismem vnímání pH a na něm závislou produkcí různých proteáz, jejichž optimum odpovídá aktuálním podmínkám (Martinez-Rossi et al., 2012). Dalším důvodem může být využití rozdílných kultivačních metod. Při porovnání více kultivačních podmínek se ukazuje, že exprese genů pro sekretované proteázy je oproti *in vitro* kultivaci v tekutých médiích *ex vivo* i *in vivo* podmínkách silně potlačena (Du et al., 2016; Staib et al., 2010). Podobných výsledků bylo dosaženo i v této práci, exprese obou sledovaných proteáz Sub 3 a Mep 3 byla při růstu na *ex vivo* kožních explantátech výrazně nižší než při růstu v tekutém médiu (tabulky 10 a 11). Zajímavý je výsledek u epidemicky se šířící populace *T. benhamiae* var. *luteum* u kterého došlo k nejmenší změně genové exprese, a to obzvláště u kmene SK 1242/12, kde byla u genu Mep 3 míra velikosti účinku jen 1,56 (tabulka číslo 12). Velmi nízká exprese Mep 3 u tohoto kmenu je zřejmě důvodem signifikantního rozdílu mezi populacemi při růstu v tekutém Sabouraudově médiu, údaje pro ostatní kmeny jsou totiž jinak poměrně uniformní. Nízké hodnoty exprese genů pro sekretované proteázy *in vivo* podmínkách a podmínkách které se reálnému průběhu infekce blíží naznačují, že sekretované proteázy nejsou tak významným faktorem virulence, jak se dlouho předpokládalo.

5.1.4. Geny spojené s metabolismem

Analýza transkriptomu metodou sekvenace RNA poukázala i na další složky metabolismu lišící se mezi kmeny svou genovou expresí. U kmene NUBS 13002 neepidemického druhu *T. japonicum* byla pozorována up-regulace genu ARB 04859 pro enzym oxalát dekarboxyláza. Tento multimerní enzym má spojitost s glyoxylátovým cyklem, slouží k rozkladu oxalátu a kyseliny šťavelové a je běžně nacházen u druhů hub napříč oddělením vřeckovýtrusných a stopkovýtrusných hub (Mäkelä et al., 2010). Gen pro tento enzym byl up-regulován i při růstu *T. rubrum* v tekutých médiích (Zaugg et al., 2009), stejně jako geny

pro malát syntázu a izocitrát lyázu, další enzymy mající spojitost s glyoxylátovým cyklem (Staib et al., 2010; Zaugg et al., 2009). Tento cyklus umožňuje organismům jako zdroj uhlíku využívat dvouuhlíkaté sloučeniny, a ačkoliv je v patogenezi dermatofytů přehlížený, je důležitou prerekvizitou virulence některých jiných houbových patogenů. K up-regulaci genů pro izocitrát lyázu i malát syntázu dochází při pozření kvasinky *Candida albicans* makrofágy, mutanti tohoto druhu bez izocitrát lyázy jsou dokonce avirulentní (Lorenz and Fink, 2001). Mutanti druhu *Cryptococcus neoformans* kterým izocitrát lyáza chyběla však měli virulenci zachovanou (Rude et al., 2002). Stejný, tedy velmi nízký, vliv absence izocitrát lyázy na virulenci byl popsán u druhu *Aspergillus fumigatus*, kde byla nicméně potvrzena role těchto enzymů při rozkladu acetátu a mastných kyselin, a tím pádem i v růstu na hostitelských tkáních. Absence produkce těchto enzymů byla také popsána při růstu v médiu bohatém na glukózu (Olivas et al., 2008). Enzymy glyoxylátového cyklu proto nejspíš nejsou faktory virulence *sensu stricto*, upregulace jejich genů však poukazuje na schopnost využívat lipidy jakožto zdroj uhlíku. Kůže lidí i zvířat je bohatým zdrojem těchto látek (Lampe et al., 1983; Nicolaides et al., 1968) a některé druhy dermatofytů jsou schopny produkovat celou řadu lipáz (Hellgren and Vincent, 1981; Sharifzadeh and Shokri, 2016). Během infekce tedy nejspíš dochází k rozkladu kožních lipidů, které jsou možným dodatečným zdrojem energie k energii získané rozkladem keratinu.

Z dalších různě exprimovaných genů souvisejících s metabolismem lze zmínit geny ARB_00746, ARB_01027, ARB_05391 a ARB_02932, které všechny souvisí s transportem živin. Všechny tyto geny byly up-regulované u kmene NUBS 13002, tedy zástupce neepidemické populace. Zdá se, že tento jedinec oproti zástupcům epidemické populace investuje mnohem více energie do příjmu a transportu živin.

5.1.5. Geny spojené s adherencí

Důležitou skupinou virulenčních faktorů hub jsou u dermatofytů zatím neprozkoumané adheziny. Známou skupinou proteinů zajišťujících tuto funkci jsou hydrofobiny. Exprese genu ARB_06975 pro hydrofobin HypA se při porovnání zástupců epidemické a neepidemické populace metodou RNAseq lišil nejvíce ze všech genů. Exprese tohoto genu byla měřena i metodou RT-qPCR. Ta odhalila odlišnost epidemické populace *T. benhamiae* var. *luteum* od ostatních sledovaných populací. Při růstu v tekutých kulturách i na myších kožních explantátech vykazuje tato populace nejvyšší expresi Hyp A, především u kmenů IHEM 25742 a SK 1242/12. Ačkoliv byly pozorované rozdíly v expresi tohoto genu mezi populacemi při růstu na myších kožních explantátech statisticky signifikantní, je nutné si povšimnout,

že kmeny chybějící v této analýze vykazují při růstu v tekutém médiu odlišnou expresi než ostatní zástupci stejné populace ve stejných podmínkách a výsledek proto může být falešně pozitivní. Exprese genu pro tento hydrofobin zatím nebyla u dermatofyt zkoumána a není proto možné výsledky této diplomové práce srovnat s dostupnou literaturou.

Dalším potenciálním adhezinem, na který poukázala analýza RNAseq je protein s fasciclinovou (FAS) doménou (ARB_0799), jehož exprese byla vyšší u neepidemických populací versus epidemické populace v obou analýzách. Proteiny s FAS doménou mohou být sekretované i vázané v membráně, v případě proteinu kódovaného genem ARB_07991 se podle databáze UniProt jedná o membránově vázaný glykoprotein s dvěma FAS doménami. Proteiny s fasciclinovou doménou představují jeden z nejstarších adhezních mechanismů napříč říši (Huber and Sumper, 1994; Zinn et al., 1988). Jsou například faktorem virulence *Batrachochytrium dendrobatidis*, významného patogenu obojživelníků (Rosenblum et al., 2008). Tyto proteiny zatím nebyly spojovány s virulencí dermatofytů, mohlo by se tedy jednat o nově popsany potenciální faktor virulence. Zajímavý je navíc fenomén, kdy kmeny IHEM 25742 a SK 1242/12, patřící do epidemické populace, spolu s kmenem NUBS 13002, patřícím do druhu *T. japonicum* vykazují v tekutém Sabouraudově médiu nejvyšší expresi Hyp A v kontrastu s nejnižší expresí proteinu s fasciclinovou doménou. Oba zmiňované potenciální adheziny jsou také nejvíce vysvětlujícími faktory v analýze PCA (obrázek číslo 10). Nízká exprese genu pro jeden adhezní protein by tedy mohla být substituována zvýšením exprese genu jiného adhezního proteinu. Exprese potenciálních adhezínů bude ale zřejmě ovlivněna mnoha faktory. Kromě adheze zajišťuje Hyp A stejně jako ostatní hydrofobiny nesmáčivost mycelia (Linder et al., 2005). Průměrná velikost míry účinku tohoto genu je nejvyšší ze všech sledovaných genů (tabulka číslo 12). Je tedy možné, že jeho exprese je výrazně zvýšena i kvůli podmínkám růstu, kdy houba roste zcela ponořená v tekutině. To může mimo jiné poukazovat na lepší schopnost epidemických zástupců odolávat stresovým podmínkám.

5.1.6. Geny spojené s odoláváním stresu

Lepší odolnost *T. benhamiae* var. *luteum* vůči stresu naznačují i další up-regulované geny, na které poukázala pilotní RNAseq analýza (tabulka číslo 12). Jedná se o protein teplotního šoku Awh11 (ARB_07483), popsany z dormantních konidií druhu *Aspergillus fumigatus* (Suh et al., 2012) a dále o protein Sba1 (ARB_01724), který je ko-chaperonem proteinu Hsp90. Chaperon Hsp90 pomáhá v organismech eukaryot maturovat a stabilizovat mnoho různých regulačních proteinů a je významným molekulárním faktorem ovlivňujícím

schopnost organismů dlouhodobě se přizpůsobit měnícím se vnějším podmínkám udržení morfogeneze a fenotypu (Queitsch et al., 2002; Rutherford and Lindquist, 1998). Ko-chaperon Sba1 stabilizuje Hsp90 ve stavu vazby s ATP, čímž zvyšuje účinnost jeho působení na stabilizované proteiny (Ali et al., 2006; Young and Hartl, 2000). U hub je tento chaperon nezbytný pro rezistenci vůči léčivům, ko-chaperon Sba1 je jedním z významných faktorů stojících za rezistencí vůči azolovým antimykotikům (Gu et al., 2016). Schopnost tohoto ko-chaperonu udržovat stálý fenotyp je zároveň výhodná právě pro epidemicky se šířící patogen, pro který jsou jakékoliv mutace nevýhodné. Tato funkce je o to významnější, když přihlédneme k faktu, že zástupci komplexu *T. benhamiae* se až na výjimky rozmnožují klonálně a jsou tedy náchylní k hromadění nevhodných mutací.

K mutacím může docházet např. poškozením DNA, toto riziko svou činností snižují různé opravné mechanismy. U epidemického zástupce byla pozorována up-regulace exprese DNA opravného a transkripčního faktoru Ada (ARB_04058). Tato rodina proteinů je významnou složkou regulačního a opravného aparátu DNA prokaryot i eukaryot. U *E. coli* zprostředkuje tento faktor odpověď na poškození DNA, a to jakožto transkripční faktor aktivující adaptivní odpověď a zároveň jako methyltransferáza (Lindahl et al., 1988; Volkert, 1988). Jeho hlavní funkcí je oprava poškození vzniklých působením methylačních činidel (He et al., 2005). Významné poškození DNA způsobuje také oxidativní stres (Barzilai and Yamamoto, 2004). S reakcí na tento druh stresu souvisí u hub protein opsin (Wang et al., 2018). V RNAseq analýze provedené v této práci byl gen pro potenciální opsin (ARB_06241) třetím nejvíce up-regulovaným genem u zástupce epidemické populace při srovnání se zástupcem neepidemickým. Exprese tohoto genu byla u *T. benhamiae* pozorována už dříve, při *in vivo* podmínkách na živých morčatech to byl dokonce jeden z nejvíce up-regulovaných genů (Staib et al., 2010). Opsin byl poprvé popsán u druhu *Neurospora crassa* jako protein nop-1 (Bieszke et al., 1999). V rámci Ascomycota existují čtyři skupiny opsinů, opsin *T. benhamiae* spadá do nejzastoupenějšího z nich, tedy nop-1, stejně tak jako opsin *Coccidioides posadasii* (Wang et al., 2018), který je potenciálním faktorem virulence tohoto druhu (Delgado et al., 2004).

Dalšími geny, na které poukázala RNAseq a které svým způsobem souvisí se stresem, jsou u epidemické populace up-regulované geny ARB_04467 pro potenciální glukonázu a ARB_03514 pro chitinázu ChiA2 a ARB_05392 pro potenciální chitinázu. Glukonázy a chitinázy jsou nezbytné pro růst hub a remodelaci buněčné stěny (Adams, 2004). Schopnost přestavby buněčné stěny v reakci na vnější podněty je u některých hub významným virulenčním faktorem (Cole and Hung, 2001). Chitinázy některých hub mohou být navíc nástrojem v kompetičním boji s dalšími druhy mikromycet (Chet and Inbar, 1994).

5.1.7. Geny spojené s produkcí sekundárních metabolitů

Nejvýznamnějším nástrojem hub v kompetičním boji s ostatními mikroorganismy jsou ale především různé sekundární metabolity (Künzler, 2018). Výsledky RNAseq analýzy naznačily, že se v expresi genů různých enzymů účastnících se produkce sekundárních metabolitů oba sledovaní zástupci významně liší. U kmenu NUBS 13002, zástupce neepidemické populace, byly up-regulovány geny pro polyketid-syntázu pksP/Alb 1 (ARB_0799) a pro polyketid-syntázu podobnou LovB (ARB_07534). Polyketid-syntáza pksP/Alb 1 je u druhu *Aspergillus fumigatus* zodpovědná za syntézu melaninu, hydrofobicita povrchu konidií mutantů Δ pksP je výrazně snížena, stejně jako jejich adherence k hostitelské tkáni (Pihet et al., 2009). Exprese tohoto genu byla v této práci studována metodou RT-qPCR, nepřinesla však žádné zajímavé poznatky. Naopak velmi zajímavým objevem této práce je up-regulace genu ARB_04645 u kmenu IHEM 25742. Tento gen není anotován v databázi NCBI, podle databáze UniProt je jeho produktem kataláza EasC. Jedná se o enzym patřící do dráhy syntézy námelových alkaloidů, jeho úlohou je tvorba látky chanoclavin I, centrálního prekursoru této dráhy (Goetz et al., 2011; Nielsen et al., 2014). Klastry genů pro syntézu námelových alkaloidů byly u dermatofytů metodou genome mining nalezeny už dříve (Wallwey et al., 2012), nijak výrazně jim však nebyla věnována pozornost. Exprese genu pro EasC byla při růstu v tekutých kulturách u všech sledovaných kmenů vyšší než při růstu na kožních explantátech, zajímavé ale je, že v těchto podmínkách byla nejvyšší právě u zástupců epidemické populace *T. benhamiae* var. *luteum*. Ačkoliv se sledované populace v expresi tohoto genu mezi sebou signifikantně neliší, bude dráze biosyntézy námelových alkaloidů u komplexu *T. benhamiae* v budoucnu věnována zvýšená pozornost. Dalším potenciálně zajímavým up-regulovaným genem epidemického zástupce je cytochrom p450 monooxygenáza (ARB_07818). Tento enzym se významně podílí na úpravě některých sekundárních metabolitů včetně mykotoxinů (Kelkar et al., 1997) a je spojován s patogenitou některých druhů hub (Soanes et al., 2008).

U dermatofytů byla již dříve navržena produkce mykotoxinů podobných aflatoxinům (Kaliciński et al., 1975). Důležitým enzymem uplatňujícím se v dráze syntézy aflatoxinů je sterigmatocystin 8-O-methyltransferáza (Bhatnagar et al., 1992). Neepidemickým kmenem up-regulovaný gen ARB_07989 pro O-methyltransferázu vykazuje podle nástroje BLAST vysokou podobnost (85,64 %, E-value 0.0) s genem MGYG_08689 druhu *Nannizzia gypseum*, s *T. benhamiae* blízkce příbuzným druhem patřícím též do skupiny dermatofytů. Epidemickým zástupcem *T. benhamiae* var. *luteum* je zase up-regulován gen ARB_06429 pro jinou, blíže neurčenou O-methyltransferázu. U pozorovaných zástupců tedy může docházet

k využívání různých genů kódujících podobné funkční produkty. Zástupci různých populací *T. benhamiae* by proto mohli produkovat odlišné a potenciálně zajímavé sekundární metabolity s toxickými vlastnostmi, jak naznačují i výsledky analýzy volatilních metabolitů.

5.2. Volatilní organické látky

Volatilní organické látky jsou celou samostatnou skupinou sekundárních metabolitů hub. Asi nejtypičtějším zástupcem je okt-1-en-3-ol dodávající houbám jejich typické aroma (Kaminski et al., 1974). Jak již bylo řečeno dříve, spektrum těchto látek lze využít k chemotaxonomii zástupců rodu *Penicillium* (Larsen and Frisvad, 1995b, 1995a), dále k identifikaci různých druhů stopkovýtrusných hub (Malheiro et al., 2013) i lidských houbových patogenů (Koo et al., 2014; Rees et al., 2017). Kvůli nedostatečným znalostem spektra volatilních látek nebyla u dermatofytů studována role těchto látek v patogenezi. Volatilní látky hub přitom mohou mít významné cytotoxické, antibakteriální a antimykotické účinky (Morath et al., 2012) a významně se tak na průběhu onemocnění podílet.

5.2.1. Optimalizace kultivace pro GC-MS analýzu

Pro kultivaci kmenů *T. benhamiae* byla zvolena metoda kultivace na ovčí vlně jakožto zdroji keratinu. Kultivace hub přímo v uzavřených headspace vialkách má totiž velmi omezené možnosti výběru kultivačního média. Jakékoliv předběžné pokusy využívající látky s komplexním složením, např. pepton či malt extrakt byly zatíženy velkým šumem pozadí způsobeným uvolňováním volatilních látek z těchto médií. Tím pádem znemožňovaly identifikaci volatilních metabolitů hub. Metoda kultivace použitá v této diplomové práci využívající pouze ovčí vlnu, agar, glukózu a vodu tímto problémem zatížena nebyla. Ovčí vlna byla vybrána pro svou snadnou dostupnost, byla sterilována autoklávováním, ale nebyla odtučněna, protože tuky představují vedle keratinu pro dermatofyty další zdroj živin. Metodu znesnadnila neschopnost studovaných kmenů růst v tomto médiu při inokulaci z agarového média přímo do headspace vialek. Tento problém byl nejspíš způsoben degenerací kmenů dlouhodobě kultivovaných na komplexních médiích. Byl proto přidán kultivační mezikrok zahrnující preinokulační médium obsahující minerální tekuté médium Czapek-Dox, ovčí vlnu a látky esenciální pro růst dermatofytů. V tomto médiu rostly studované kmeny zdárně, stejně jako po inokulaci na finální médium ve vialkách. Metoda kultivace přímo ve vialkách je pro analýzu GC-MS výhodná, protože umožňuje přímou identifikaci látek ze vzorku a není zatížená krokem izolace látek pro GC-MS analýzu, kdy dochází ke kvantitativním i kvalitativním ztrátám materiálu.

5.2.2. Analýza volatilních organických látek

Postup GC-MS analýzy byl v této práci zvolen úpravou metody k identifikaci aldehydů (Semerád et al., 2019), která je v Laboratoři enviromentální biotechnologie MBÚ AV ČR, kde analýza probíhala, dobře zavedená. Aldehydy jsou významnou a poměrně dobře popsanou složkou volatomu (souboru všech produkovaných volatilních organických látek) hub (Raguso and Roy, 1998; Zhou et al., 2015). Při vyhodnocování dat byly mezi jednotlivými kmeny porovnávány pouze látky mající fold change vyšší než 16. Takto přísná kritéria byla zvolena za účelem vyšší vypovídající hodnoty rozdílů mezi jednotlivými kmeny a zároveň jednodušší analýzy dat. Píky pro předběžně určené látky pak byly v chromatogramech procházeny ručně, aby bylo ověřeno, že jsou opravdu specifické pouze pro příslušný taxon.

Produkce spekter látek specifických pro jednotlivé populace u komplexu *T. benhamiae* nebyla analýzou provedenou v této práci potvrzena. Pouze epidemická populace *T. benhamiae* var. *luteum* vykazovala specifické spektrum. Ačkoliv byla struktura několika látek specifických pro tuto populaci předběžně určena, přesné charakterizace bude v budoucnu dosaženo až srovnáním se standardy. Cytotoxické a antimikrobiální účinky těchto látek zase budou prozkoumány tvorbou bioassayů. Předběžně určené látky produkované pouze epidemickou populací by totiž mohly mít významné bioaktivní účinky.

Většina volatilních organických látek popsaných v této práci (obrázek číslo 12 a přílohy 5 až 9) je u hub pozorována poprvé. Jedinou z předběžně určených látek, která už byla u hub popsána je akutně toxický 3,5-dimethyanisol. Identifikována byla u ektomykorhizního druhu *Laccaria bicolor* (Müller et al., 2013) a u endofytu *Nodulisporium* sp. (Sánchez-Fernández et al., 2016). U druhů rodu *Hypoxylon* byla popsána podobná látka 3,4-dimethylanisol (Rinkel et al., 2018), vzhledem k pouze předběžnému určení struktury by se mohlo jednat i o tuto sloučeninu. Látka 2,3,4-trimethylthiofen zatím u hub identifikována nebyla, je však součástí esenciálního oleje rostlin rodu *Ferula*, který se vyznačuje významnými antimikrobiálními účinky (Kavoosi et al., 2013; Pavela et al., 2020). Také látka 4-(1,1-dimethylethyl)-2-methyl-thiofenol by mohla být, podobně jako 2,3,4-trimethylthiofen vysoce toxická a dráždivá. Její derivát 2-methyl-thiofenol byl nalezena v rostlinném extraktu z *Torreyia grandis* vyznačujícím se antifungálními účinky (Hamad et al., 2016). Látky methylether-3-ethylfenol a 13 β -methyl-13-vinyl-podocarp-8(14)-ene lze v literatuře dohledat jen těžko. Methylether-3-ethylfenol by mohl patřit do skupiny m-kresolů, vysoce antiseptických organických látek. M-kresol byl označen za jednu z hlavních složek volatomu *Ampelomyces* sp. a *Cladosporium* sp., přítomnost této látky vyvolávala u rostliny *Arabidopsis thaliana* systémovou rezistenci proti houbovým patogenům (Naznin et al., 2014).

Druhá zmíněná látka má poměrně složitou strukturu a k jejímu přesnému určení budou nutné složitější analýzy. Některé z látek produkováných všemi studovanými kmeny by mohly být specifické pro komplex *T. benhamiae*, tato hypotéza bude v budoucnu prověřena porovnáním se spektry volatilních organických látek dalších zástupců vláknitých hub včetně dermatofytů.

6. ZÁVĚR

Komplex *Trichophyton benhamiae* zahrnuje čtyři populace, z nichž jedna (*T. benhamiae* var. *luteum*) se v současné době epidemicky šíří Evropou. Zástupci tohoto komplexu jsou známé patogeny kůže zvířat i lidí, i přes jejich nesporný význam jsou poměrně neprozkoumanou skupinou. Tato diplomová práce se zabývala rozdílnou genovou expresí a produkcí volatilních organických látek mezi populacemi tohoto komplexu. Byla optimalizována metodika přípravy a uchovávání *ex vivo* myších kožních explantátů sloužících k vytvoření kultivačních podmínek co nejbližších reálným podmínkám infekce. Také byla optimalizována metodika práce s RNA dermatofytů a byly vytvořeny mRNA knihovny. Na základě literatury a výsledků sekvenace těchto knihoven bylo vybráno šest potenciálních genů virulence a potenciálních referenčních genů, pro které byly navrženy specifické primery. S pomocí těchto primerů byla provedena analýza genové exprese vybraných genů metodou RT-qPCR. V druhé části práce byla vytvořena metodika kultivace dermatofytů pro analýzu volatilních organických látek metodou GC-MS.

Navzdory tomu, že se pro některé kmeny nepodařilo získat výsledky RT-qPCR analýzy, však v této práci bylo potvrzeno odlišná genová exprese kmenů patřících do populace *T. benhamiae* var. *luteum*, oproti ostatním studovaným kmenům. Kromě toho byly také potvrzeny některé závěry dřívějších studií zabývajících se genovou expresí dermatofytů, především ty popisující nízkou expresi sekretovaných proteáz v podmínkách blížících se reálné infekci, a dále významný rozdíl v expresi celkově při růstu v tekutém médiu a na *ex vivo* kožních explantátech. Tato práce také poukázala na nové možné faktory virulence, jako je protein s fasciclinovou doménou, nový potenciální adhezin dermatofytů, nebo kataláza EasC, významný enzym patřící do dráhy biosyntézy námelových alkaloidů. Tato dráha zatím u dermatofytů nebyla spojována s patogenezí, její produkty přitom mohou hrát významnou roli v patogenezí hub. Zvýšená exprese genu pro tento enzym poukazuje na vysoký potenciál zástupců komplexu *T. benhamiae* produkovat sekundární metabolity.

Jednou ze skupin sekundárních metabolitů jsou také volatilní organické látky. Analýza těchto látek přinesla zajímavé výsledky v podobě předběžně určené struktury pravděpodobně vysoce toxických látek produkových výhradně zástupci epidemické populace. Porovnáním získaných spekter se spektry dalších zástupců patogenních hub bude navíc v budoucnu možné charakterizovat látky specifické pro komplex *T. benhamiae*, které by se mohly stát silným nástrojem pro diagnostiku kožních onemocnění způsobených tímto komplexem druhů.

Svým přístupem založeným na porovnání více kmenů z více populací, je tato diplomová práce mezi studii zabývajícími se genovou expresí dermatofyt unikátní a upozorňuje na důležitost výběru studovaného kmenu a kultivačních podmínek a nutnost studovat více kmenů jednoho druhu. Srovnání více a méně virulentních blízce příbuzných kmenů umožnilo pro studovaný komplex druhů identifikovat nové potenciální faktory virulence i specifické volatilní látky. V práci se podařilo všemi přístupy potvrdit původní předpoklad, že se u kmenů epidemicky se šířící populace *T. benhamiae* var. *luteum* vyvinula jiná a pravděpodobně efektivnější strategie šíření mezi hostiteli. Podle dostupných dat za touto strategií stojí větší investice do sekundárního metabolismu a faktorů souvisejících se schopností odolávat stresovým podmínkám než do příjmu potravy.

Komplexnějším studiem genové exprese komplexu *T. benhamiae* se bude spolu s přesnějším určením struktury volatilních organických látek popsanych v této práci a ověřením jejich bioaktivních vlastností zabývat nadcházející disertační práce.

Zdroje

- Abarca, M.L., Castellá, G., Martorell, J., Cabañes, F.J., 2017. *Trichophyton erinacei* in pet hedgehogs in Spain: Occurrence and revision of its taxonomic status. *Med. Mycol.* 55, 164–172. <https://doi.org/10.1093/mmy/myw057>
- Adams, D.J., 2004. Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology* 150, 2029–2035. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26980-0>
- Aimanianda, V., Bayry, J., Bozza, S., Knemeyer, O., Perruccio, K., Elluru, S.R., Clavaud, C., Paris, S., Brakhage, A.A., Kaveri, S. V., 2009. Surface hydrophobin prevents immune recognition of airborne fungal spores. *Nature* 460, 1117.
- Ali, M.M.U., Mark Roe, S., Vaughan, C.K., Meyer, P., Panaretou, B., Piper, P.W., Prodromou, C., Pearl, L.H., 2006. Crystal structure of an Hsp90-nucleotide-p23/Sba1 closed chaperone complex. *Nature* 440, 1013–1017. <https://doi.org/10.1038/nature04716>
- Aljabre, S.H.M., Richardson, M.D., Scott, E.M., Rashid, A., Shankland, G.S., 1993. Adherence of arthroconidia and germlings of anthropophilic and zoophilic varieties of *Trichophyton mentagrophytes* to human corneocytes as an early event in the pathogenesis of dermatophytosis. *Clin. Exp. Dermatol.* 18, 231–235. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2230.1993.tb02176.x>
- Aljabre, S.H.M., Richardson, M.D., Scott, E.M., Shankland, G.S., 1992. Germination of *Trichophyton mentagrophytes* on human stratum corneum in vitro. *J. Med. Vet. Mycol.* 30, 145–152. <https://doi.org/10.1080/02681219280000191>
- Anamika, K., Verma, S., Jere, A., Desai, A., 2016. Transcriptomic Profiling Using Next Generation Sequencing - Advances, Advantages, and Challenges, in: Next Generation Sequencing - Advances, Applications and Challenges. InTech. <https://doi.org/10.5772/61789>
- Andersen, C.L., Jensen, J.L., Ørntoft, T.F., 2004. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* 64, 5245–5250. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0496>
- Ates, A., Ilkit, M., Ozdemir, R., Ozcan, K., 2008. Dermatophytes isolated from asymptomatic dogs in Adana, Turkey: A preliminary study. *J. Mycol. Med.* 18, 154–157. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2008.07.001>
- Băguț, E.T., Baldo, A., Mathy, A., Cambier, L., Antoine, N., Cozma, V., Mignon, B., 2012. Subtilisin Sub3 is involved in adherence of *Microsporum canis* to human and animal epidermis. *Vet. Microbiol.* 160, 413–419. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.06.011>
- Baldo, A., Mathy, A., Tabart, J., Camponova, P., Vermout, S., Massart, L., Maréchal, F., Galleni, M., Mignon, B., 2010. Secreted subtilisin Sub3 from *Microsporum canis* is required for adherence to but not for invasion of the epidermis. *Br. J. Dermatol.* 162, 990–997. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2009.09608.x>
- Barzilai, A., Yamamoto, K.I., 2004. DNA damage responses to oxidative stress. *DNA Repair (Amst.)* 3, 1109–1115. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2004.03.002>
- Baumbach, C.M., Michler, J.K., Nenoff, P., Uhrlaß, S., Schrödl, W., 2020a. Visualising virulence factors: *Trichophyton benhamiae*'s subtilisins demonstrated in a guinea pig skin ex vivo model. *Mycoses* 13136. <https://doi.org/10.1111/myc.13136>
- Baumbach, C.M., Schrödl, W., Nenoff, P., Uhrlaß, S., Mülling, C.K.W., Michler, J.K., 2020b. Modeling dermatophytosis: Guinea pig skin explants represent a highly suitable model to study *Trichophyton benhamiae* infections. *J. Dermatol.* 47, 8–16. <https://doi.org/10.1111/1346-8138.15150>
- Bayry, J., Aimanianda, V., Guijarro, J.I., Sunde, M., Latge, J.-P., 2012. Hydrophobins—unique fungal

- proteins. PLOS Pathog. 8, e1002700.
- Beauvais, A., Monod, M., Debeaupuis, J.-P., Diaquin, M., Kobayashi, H., Latgé, J.-P., 1997. Biochemical and antigenic characterization of a new dipeptidyl-peptidase isolated from *Aspergillus fumigatus*. J. Biol. Chem. 272, 6238–6244.
- Bhatnagar, D., Ehrlich, K.C., Cleveland, T.E., 1992. Oxidation-reduction reactions in biosynthesis of secondary metabolites. Handb. Appl. Mycol. vol. 5. Mycotoxins Ecol. Syst. 5, 255–286.
- Bieszke, J.A., Braun, E.L., Bean, L.E., Kang, S., Natvig, D.O., Borkovich, K.A., 1999. The nop-1 gene of *Neurospora crassa* encodes a seven transmembrane helix retinal-binding protein homologous to archaeal rhodopsins. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96, 8034–8039. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.14.8034>
- Blank, F., Day, W.C., Just, G., 1963. Metabolites of pathogenic fungi. II. The isolation of xanthomegnin from *Trichophyton megnini* Blanchard 1896. J. Invest. Dermatol. 40.
- Blomquist, G., Andersson, B., Andersson, K., Brondz, I., 1992. Analysis of fatty acids. A new method for characterization of moulds. J. Microbiol. Methods 16, 59–68. [https://doi.org/10.1016/0167-7012\(92\)90025-Y](https://doi.org/10.1016/0167-7012(92)90025-Y)
- Boonacker, E.P., Wierenga, E.A., Smits, H.H., Noorden, C.J.F. Van, 2002. CD26/DPPIV signal transduction function, but not proteolytic activity, is directly related to its expression level on human Th1 and Th2 cell lines as detected with living cell cytochemistry. J. Histochem. Cytochem. 50, 1169–1177.
- Brasch, J., Wodarg, S., 2015. Morphological and physiological features of *Arthroderma benhamiae* anamorphs isolated in northern Germany. Mycoses 58, 93–98. <https://doi.org/10.1111/myc.12280>
- Brouha, F., Descamps, F., Vermout, S., Monod, M., Losson, B., Mignon, B., 2003. Humoral and cellular immune response to a *Microsporum canis* recombinant keratinolytic metalloprotease (r-MEP3) in experimentally infected guinea pigs. Med. Mycol. 41, 495–501.
- Buist, G., Steen, A., Kok, J., Kuipers, O.P., 2008. LysM, a widely distributed protein motif for binding to (peptido) glycans. Mol Microbiol 68, 838–847.
- Burmester, A., Shelest, E., Glöckner, G., Heddergott, C., Schindler, S., Staib, P., Heidel, A., Felder, M., Petzold, A., Szafranski, K., Feuermann, M., Pedruzzi, I., Priebe, S., Groth, M., Winkler, R., Li, W., Kniemeyer, O., Schroeckh, V., Hertweck, C., Hube, B., White, T.C., Platzer, M., Guthke, R., Heitman, J., Wöstemeyer, J., Zipfel, P.F., Monod, M., Brakhage, A.A., 2011. Comparative and functional genomics provide insights into the pathogenicity of dermatophytic fungi. Genome Biol. 12, R7. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-1-r7>
- Burnett, L.A.C., Lunn, G., Coico, R., 2009. Biosafety: Guidelines for working with pathogenic and infectious microorganisms. Curr. Protoc. Microbiol. 13, 111. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc01a01s13>
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer, C.T., 2009. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clin. Chem. 55, 611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
- Cambier, L., Heinen, M.-P., Mignon, B., 2017. Relevant animal models in dermatophyte research. Mycopathologia 182, 229–240.
- Cambier, L., Weatherspoon, A., Defaweux, V., Bagut, E.T., Heinen, M.P., Antoine, N., Mignon, B., 2014. Assessment of the cutaneous immune response during *Arthroderma benhamiae* and *A. vanbreuseghemii* infection using an experimental mouse model. Br. J. Dermatol. 170, 625–633. <https://doi.org/10.1111/bjd.12673>

- Casadevall, A., Pirofski, L., 2009. Virulence factors and their mechanisms of action: the view from a damage–response framework. *J. Water Health* 7, S2–S18.
- Chet, I., Inbar, J., 1994. Biological control of fungal pathogens. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 48, 37–43. <https://doi.org/10.1007/BF02825358>
- Ciesielska, A., Oleksak, B., Stączek, P., 2019. Reference genes for accurate evaluation of expression levels in *Trichophyton interdigitale* grown under different carbon sources, pH levels and phosphate levels. *Sci. Rep.* 9, 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42065-5>
- Ciesielska, A., Staczek, P., 2018. Selection and validation of reference genes for qRT-PCR analysis of gene expression in *Microsporum canis* growing under different adhesion-inducing conditions. *Sci. Rep.* 8, 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19680-9>
- Cole, G.T., Hung, C.Y., 2001. The parasitic cell wall of *Coccidioides immitis*. *Med. Mycol. Suppl.* 39, 31–40. <https://doi.org/10.1080/mmy.39.1.31.40>
- Corzo-León, D.E., Munro, C.A., MacCallum, D.M., 2019. An ex vivo human skin model to study superficial fungal infections. *Front. Microbiol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01172>
- Dahl, M. V., 1994. Dermatophytosis and the immune response. *J. Am. Acad. Dermatol.* 31, S34–S41.
- De Jonge, R., Thomma, B.P.H.J., 2009. Fungal LysM effectors: extinguishers of host immunity? *Trends Microbiol.* 17, 151–157.
- Degreef, H., 2008. Clinical forms of dermatophytosis (ringworm infection). *Mycopathologia* 166, 257–265. <https://doi.org/10.1007/s11046-008-9101-8>
- Delgado, N., Hung, C.Y., Tarcha, E., Gardner, M.J., Cole, G.T., 2004. Profiling gene expression in *Coccidioides posadasii*. *Med. Mycol.* 42, 59–71. <https://doi.org/10.1080/1369378031000156890>
- Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., Gingeras, T.R., 2013. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29, 15–21. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635>
- Donnelly, T.M., Rush, E.M., Lackner, P.A., 2000. Ringworm in small exotic pets. *Semin. Avian Exot. Pet Med.* 9, 82–93. <https://doi.org/10.1053/ax.2000.5045>
- Drouot, S., Mignon, B., Fratti, M., Roosje, P., Monod, M., 2009. Pets as the main source of two zoonotic species of the *Trichophyton mentagrophytes* complex in Switzerland, *Arthroderma vanbreuseghemii* and *Arthroderma benhamiae*. *Vet. Dermatol.* 20, 13–18. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2008.00691.x>
- Duek, L., Kaufman, G., Ulman, Y., Berdicevsky, I., 2004. The pathogenesis of dermatophyte infections in human skin sections. *J. Infect.* 48, 175–180. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jinf.2003.09.008>
- Duffy, E., Morrin, A., 2019. Endogenous and microbial volatile organic compounds in cutaneous health and disease. *TrAC - Trends Anal. Chem.* <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.12.012>
- Faway, É., Cambier, L., Mignon, B., Poumay, Y., De Rouvroit, C.L., 2017. Modeling dermatophytosis in reconstructed human epidermis: A new tool to study infection mechanisms and to test antifungal agents. *Med. Mycol.* 55, 485–494. <https://doi.org/10.1093/mmy/myw111>
- Frisvad, J.C., Andersen, B., Thrane, U., 2008. The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi. *Mycol. Res.* 112, 231–240. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.08.018>
- Frisvad, J.C., Filtenborg, O., 1990. Revision of *Penicillium* Subgenus *Furcatum* Based on Secondary Metabolites and Conventional Characters. *Mod. Concepts Penicillium Aspergillus Classif.* 159–172. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-3579-3_14

- Frisvad, J.C., Filtenborg, O., Samson, R.A., Stolk, A.C., 1990. Chemotaxonomy of the genus *Talaromyces*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 57, 179–189. <https://doi.org/10.1007/BF00403953>
- Frisvad, J.C., Samson, R.A., 2004. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*: A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. *Stud. Mycol.* 2004, 1–173.
- Fujii, T., Nozawa, Y., Ito, Y., 1966. The Pigments of Dermatophytes I. *Japanese J. Med. Mycol.*
- Garvey, K.J., Saedi, M.S., Ito, J., 1986. Nucleotide sequence of *Bacillus* phage ø29 genes 14 and 15: Homology of gene 15 with other phage lysozymes. *Nucleic Acids Res.* 14, 10001–10008. <https://doi.org/10.1093/nar/14.24.10001>
- Ge, L., Huang, Z., Wei, H., 2011. Skin graft preservation, in: *Skin Grafts-Indications, Applications and Current Research*. IntechOpen.
- Georg, L.K., 1960. Epidemiology of the dermatophytoses sources of infection, modes of transmission and epidemicity. *Ann N Y Acad Sci* 89, 69–77.
- Goetz, K.E., Coyle, C.M., Cheng, J.Z., O'Connor, S.E., Panaccione, D.G., 2011. Ergot cluster-encoded catalase is required for synthesis of chanoclavine-I in *Aspergillus fumigatus*. *Curr. Genet.* 57, 201–211. <https://doi.org/10.1007/s00294-011-0336-4>
- Grumbt, M., Monod, M., Yamada, T., Hertweck, C., Kunert, J., Staib, P., 2013. Keratin Degradation by Dermatophytes Relies on Cysteine Dioxygenase and a Sulfite Efflux Pump. *J. Invest. Dermatol.* 133, 1550–1555. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/jid.2013.41>
- Gu, X., Xue, W., Yin, Y., Liu, H., Li, S., Sun, X., 2016. The Hsp90 co-chaperones Sti1, Aha1, and P23 regulate adaptive responses to antifungal azoles. *Front. Microbiol.* 7, 1571. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01571>
- Gupta, A.K., Ahmad, I., Borst, I., Summerbell, R.C., 2000. Detection of xanthomegnin in epidermal materials infected with *Trichophyton rubrum*. *J. Invest. Dermatol.* 115, 901–905. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2000.00150.x>
- Hakanpää, J., Paananen, A., Askolin, S., Nakari-Setälä, T., Parkkinen, T., Penttilä, M., Linder, M.B., Rouvinen, J., 2004. Atomic Resolution Structure of the HFBII Hydrophobin, a Self-assembling Amphiphile. *J. Biol. Chem.* 279, 534–539. <https://doi.org/10.1074/jbc.M309650200>
- Hamad, K.Y., Chorianopoulos, N., Karatzas, K.A.G., Banat, I.M., 2016. Activity of plant extracts/essential oils against three plant pathogenic fungi and mosquito larvae: GC/MS analysis of bioactive compounds. *Biomed Res. Int.* 2016, 4489–4511. <https://doi.org/10.1155/2016/9749305>
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T., Ryan, P.D., 2001. Past: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol. Electron.* 4, 178.
- Havlickova, B., Czaika, V.A., Friedrich, M., 2008. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses* 51, 2–15. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2008.01606.x>
- He, C., Hus, J.C., Li, J.S., Zhou, P., Norman, D.P.G., Dötsch, V., Wei, H., Gross, J.D., Lane, W.S., Wagner, G., Verdine, G.L., 2005. A methylation-dependent electrostatic switch controls DNA repair and transcriptional activation by *E. coli* Ada. *Mol. Cell* 20, 117–129. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.08.013>
- Heddergott, C., Bruns, S., Nietzsche, S., Leonhardt, I., Kurzai, O., Kniemeyer, O., Brakhage, A.A., 2012. The *Arthroderma benhamiae* hydrophobin HypA mediates hydrophobicity and influences recognition by human immune effector cells. *Eukaryot Cell* 11, 673–682. <https://doi.org/10.1128/EC.00037-12>
- Hellgren, L., Vincent, J., 1981. Lipolytic activity of some dermatophytes. *J. Med. Microbiol.* 14, 347–

- Hesse, J., Burmester, A., Graeser, Y., Kupsch, C., Hipler, U., Wiegand, C., 2019. Is there a correlation between *Trichophyton benhamiae* genotype and virulence? *Exp. Dermatol.* 28, E79–E80.
- Hesse, J., Wiegand, C., Rahmig, N., Graeser, Y., Kupsch, C., Hipler, U.C., 2017. Determination of different virulence factors of white and yellow strains of *Trichophyton benhamiae* from human and animal sources. *Mycoses* 60, 4–5.
- Hiruma, J., Kano, R., Harada, K., Monod, M., Hiruma, M., Hasegawa, A., Tsuboi, R., 2015. Occurrence of *Arthroderma benhamiae* Genotype in Japan. *Mycopathologia* 179, 219–223. <https://doi.org/10.1007/s11046-014-9839-0>
- Huber, O., Sumper, M., 1994. Algal-CAMs: Isoforms of a cell adhesion molecule in embryos of the alga *Volvox* with homology to *Drosophila* fasciclin I. *EMBO J.* 13, 4212–4222. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06741.x>
- Hubka, V., Peano, A., Cmokova, A., Guillot, J., 2018. Common and emerging dermatophytoses in animals: Well-known and new threats. *Emerg. Epizoot. Fungal Infect. Anim.* 31–79. https://doi.org/10.1007/978-3-319-72093-7_3
- Hubka, V., Větrovský, T., Dobiášová, S., Škořepová, M., Lysková, P., Mencl, K., Mallátová, N., Janouškovcová, H., Hanzlíčková, J., Dobiáš, R., Čmoková, A., Stará, J., Hamal, P., Svobodová, L., Kolařík, M., 2014. Molekulární epidemiologie dermatofytóz v České republice-výsledky dvouleté studie. *Česko-Slovenská Dermatologie* 89, 149–212.
- Hussain, H., Al-Sadi, A.M., Schulz, B., Steinert, M., Khan, A., Green, I.R., Ahmed, I., 2017. A fruitful decade for fungal polyketides from 2007 to 2016: Antimicrobial activity, chemotaxonomy and chemodiversity. *Future Med. Chem.* 9, 1631–1648. <https://doi.org/10.4155/fmc-2017-0028>
- Ilkit, M., Demirhindi, H., 2008. Asymptomatic dermatophyte scalp carriage: Laboratory diagnosis, epidemiology and management. *Mycopathologia* 165, 61–71. <https://doi.org/10.1007/s11046-007-9081-0>
- Jacob, T.R., Peres, N.T.A., Persinoti, G.F., Silva, L.G., Mazucato, M., Rossi, A., Martinez-Rossi, N.M., 2012. Rpb2 is a reliable reference gene for quantitative gene expression analysis in the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. *Med. Mycol.* 50, 368–377. <https://doi.org/10.3109/13693786.2011.616230>
- Jacobson, E.S., Hove, E., Emery, H.S., 1995. Antioxidant function of melanin in black fungi. *Infect. Immun.* 63, 4944–4945.
- Jousson, O., Léchenne, B., Bontems, O., Mignon, B., Reichard, U., Barblan, J., Quadroni, M., Monod, M., 2004. Secreted subtilisin gene family in *Trichophyton rubrum*. *Gene* 339, 79–88.
- Kaliciński, J., Prochacki, H., Engelhardt-Zasada, C., 1975. Aflatoxin-like compounds produced by dermatophytes. *Mycopathologia* 55, 23–24. <https://doi.org/10.1007/BF00467086>
- Kaminski, E., Stawicki, S., Wasowicz, E., 1974. Volatile Flavor Compounds Produced by Molds of *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Fungi imperfecti*. *Appl. Microbiol.* 27, 1001–1004. <https://doi.org/10.1128/aem.27.6.1001-1004.1974>
- Kandemir, H., Ilkit, M., Çürük, A., 2015. Xanthomegnin detection does not discriminate between *Trichophyton rubrum* and *T. mentagrophytes* complexes. *J. Microbiol. Methods* 111, 122–126. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.02.009>
- Kar, B., Patel, P., Free, S.J., 2019. *Trichophyton rubrum* LysM proteins bind to fungal cell wall chitin and to the N-linked oligosaccharides present on human skin glycoproteins. *PLoS One* 14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215034>
- Kavoosi, G., Tafsiry, A., Ebdam, A.A., Rowshan, V., 2013. Evaluation of Antioxidant and

- Antimicrobial Activities of Essential Oils from *Carum copticum* Seed and *Ferula assafoetida* Latex. J. Food Sci. 78, T356–T361. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12020>
- Kelkar, H.S., Skloss, T.W., Haw, J.F., Keller, N.P., Adams, T.H., 1997. *Aspergillus nidulans* stcL encodes a putative cytochrome P-450 monooxygenase required for bisfuran desaturation during aflatoxin/sterigmatocystin biosynthesis. J. Biol. Chem. 272, 1589–1594. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.3.1589>
- Keller, N.P., Turner, G., Bennett, J.W., 2005. Fungal secondary metabolism - From biochemistry to genomics. Nat. Rev. Microbiol. 3, 937–947. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1286>
- Kombrink, A., Thomma, B.P.H.J., 2013. LysM effectors: secreted proteins supporting fungal life. PLOS Pathog. 9, 1–4.
- Koo, S., Thomas, H.R., Daniels, S.D., Lynch, R.C., Fortier, S.M., Shea, M.M., Rearden, P., Comolli, J.C., Baden, L.R., Marty, F.M., 2014. A Breath Fungal Secondary Metabolite Signature to Diagnose Invasive Aspergillosis. Clin. Infect. Dis. 59, 1733–1740. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu725>
- Kromer, C., Nenoff, P., Uhrlaß, S., Apel, A., Schön, M.P., Lippert, U., 2018. *Trichophyton erinacei* transmitted to a pregnant woman from her pet hedgehogs. JAMA Dermatology 154, 967–968. <https://doi.org/10.1001/jamadermatol.2018.1124>
- Künzler, M., 2018. How fungi defend themselves against microbial competitors and animal predators. PLOS Pathog. 14, e1007184. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007184>
- Lampe, M.A., Burlingame, A.L., Whitney, J., Williams, M.L., Brown, B.E., Roitman, E., Elias, P.M., 1983. Human stratum corneum lipids: characterization and regional variations. J. Lipid Res. 24, 120–130.
- Lanternier, F., Pathan, S., Vincent, Q.B., Liu, L., Cypowyj, S., Prando, C., Migaud, M., Taibi, L., Ammar-Khodja, A., Stambouli, O.B., Guellil, B., Jacobs, F., Goffard, J.C., Schepers, K., Del Marmol, V., Boussofara, L., Denguezli, M., Larif, M., Bachelez, H., Michel, L., Lefranc, G., Hay, R., Jouvion, G., Chretien, F., Fraitag, S., Bougnoux, M.E., Boudia, M., Abel, L., Lortholary, O., Casanova, J.L., Picard, C., Grimbacher, B., Puel, A., 2013. Deep dermatophytosis and inherited CARD9 deficiency. N. Engl. J. Med. 369, 1704–1714. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1208487>
- Larsen, T.O., Frisvad, J.C., 1995a. Chemosystematics of *Penicillium* based on profiles of volatile metabolites. Mycol. Res. 99, 1167–1174. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80272-4](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80272-4)
- Larsen, T.O., Frisvad, J.C., 1995b. Characterization of volatile metabolites from 47 *Penicillium* taxa. Mycol. Res. 99, 1153–1166. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80271-2](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80271-2)
- Lee, C.G., Da Silva, C.A., Lee, J.Y., Hartl, D., Elias, J.A., 2008. Chitin regulation of immune responses: an old molecule with new roles. Curr. Opin. Immunol. 20, 684–689. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2008.10.002>
- Lemsaddek, A., Chambel, L., Tenreiro, R., 2010. Incidence of fungalsin and subtilisin virulence genes in dermatophytes. Curr. Res. Technol. Educ. Appl. Microbiol. Microb. Biotechnol. 658–665.
- Lindahl, T., Sedgwick, B., Sekiguchi, M., Nakabeppu, Y., 1988. Regulation and expression of the adaptive response to alkylating agents. Annu. Rev. Biochem. 57, 133–157. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.57.070188.001025>
- Linder, M.B., Szilvay, G.R., Nakari-Setälä, T., Penttilä, M.E., 2005. Hydrophobins: the protein-amphiphiles of filamentous fungi. FEMS Microbiol. Rev. 29, 877–896.
- Liu, T., Liu, Z., Song, C., Hu, Y., Han, Z., She, J., Fan, G., Wang, J., Jin, C., Chang, J., Zhou, J.M., Chai, J., 2012. Chitin-induced dimerization activates a plant immune receptor. Science (80-.). 336, 1160–1164. <https://doi.org/10.1126/science.1218867>

- Lorenz, M.C., Fink, G.R., 2001. The glyoxylate cycle is required for fungal virulence. *Nature* 412, 83–86. <https://doi.org/10.1038/35083594>
- Love, M.I., Huber, W., Anders, S., 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 15. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Lowe, R., Shirley, N., Bleackley, M., Dolan, S., Shafee, T., 2017. Transcriptomics technologies. *PLoS Comput. Biol.* 13, e1005457. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005457>
- Lund, A., Bratberg, A.M., Næss, B., Gudding, R., 2014. Control of bovine ringworm by vaccination in Norway. *Vet. Immunol. Immunopathol.* <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2013.04.007>
- Lysková, P., Dobiáš, R., Kuklová, I., Mallátová, N., Čmoková, A., Kolařík, M., Vojtíšková, V., Karpetová, L., Hubka, V., 2018. Pět případů lidských dermatofytóz vyvolaných zoofilním druhem *Trichophyton erinacei* přeneseným z ježků. *Česko-Slovenská Dermatologie* 237–244.
- Mäkelä, M.R., Hildén, K., Lundell, T.K., 2010. Oxalate decarboxylase: Biotechnological update and prevalence of the enzyme in filamentous fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87, 801–814. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2650-z>
- Malheiro, R., Guedes de Pinho, P., Soares, S., César da Silva Ferreira, A., Baptista, P., 2013. Volatile biomarkers for wild mushrooms species discrimination. *Food Res. Int.* 54, 186–194. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.06.010>
- Marchisio, V.F., 2000. Keratinophilic fungi: their role in nature and degradation of keratinic substrates. *Biol. dermatophytes other keratinophilic fungi* 17, 86–92.
- Martinez-Rossi, N.M., Persinoti, G.F., Peres, N.T.A., Rossi, A., 2012. Role of pH in the pathogenesis of dermatophytoses. *Mycoses* 55, 381–387. <https://doi.org/doi:10.1111/j.1439-0507.2011.02162.x>
- Martinez, D.A., Oliver, B.G., Gräser, Y., Goldberg, J.M., Li, W., Martinez-Rossi, N.M., Monod, M., Shelest, E., Barton, R.C., Birch, E., Brakhage, A.A., Chen, Z., Gurr, S.J., Heiman, D., Heitman, J., Kosti, I., Rossi, A., Saif, S., Samalova, M., Saunders, C.W., Shea, T., Summerbell, R.C., Xu, J., Young, S., Zeng, Q., Birren, B.W., Cuomo, C.A., White, T.C., 2012. Comparative genome analysis of *Trichophyton rubrum* and related dermatophytes reveals candidate genes involved in infection. *MBio* 3. <https://doi.org/10.1128/mBio.00259-12>
- Martins, M.P., Silva, L.G., Rossi, A., Sanches, P.R., Souza, L.D.R., Martinez-Rossi, N.M., 2019. Global Analysis of Cell Wall Genes Revealed Putative Virulence Factors in the Dermatophyte *Trichophyton rubrum*. *Front. Microbiol.* 10, 2168. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02168>
- Mathy, A., Baldo, A., Schoofs, L., Cambier, L., Defaweux, V., Tabart, J., Maréchal, F., Symoens, F., Mignon, B., 2010. Fungalysin and dipeptidyl-peptidase gene transcription in *Microsporum canis* strains isolated from symptomatic and asymptomatic cats. *Vet. Microbiol.* 146, 179–182. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.04.019>
- Matousek, J.L., Campbell, K.L., 2002. A comparative review of cutaneous pH. *Vet. Dermatol.* 13, 293–300.
- Mercer, D.K., Stewart, C.S., 2018. Keratin hydrolysis by dermatophytes. *Med. Mycol.*
- Mignon, B., Swinnen, M., Bouchara, J.P., Hofinger, M., Nikkels, A., Pierard, G., Gerday, C.H., Losson, B., 1998. Purification and characterization of a 315 kDa keratinolytic subtilisin-like serine protease from *Microsporum canis* and evidence of its secretion in naturally infected cats. *Med. Mycol.* 36, 395–404.
- Mignon, B.R., Losson, B.J., 1997. Prevalence and characterization of *Microsporum canis* carriage in cats. *J. Med. Vet. Mycol.* 35, 249–256.
- Mohaghehpour, N., Waleh, N., Garger, S.J., Dousman, L., Grill, L.K., Tusé, D., 2000. Synthetic melanin suppresses production of proinflammatory cytokines. *Cell. Immunol.* 199, 25–36.

- Monod, M., 2008. Secreted proteases from dermatophytes. *Mycopathologia* 166, 285–294. <https://doi.org/10.1007/s11046-008-9105-4>
- Monod, M., L  chenne, B., Jousson, O., Grand, D., Zaugg, C., St  cklin, R., Grouzmann, E., 2005. Aminopeptidases and dipeptidyl-peptidases secreted by the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. *Microbiology* 151, 145–155. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27484-0>
- Monti, D., Saccomani, L., Chetoni, P., Burgalassi, S., Tampucci, S., Mailland, F., 2011. Validation of bovine hoof slices as a model for infected human toenails: In vitro ciclopirox transungual permeation. *Br. J. Dermatol.* 165, 99–105. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2011.10303.x>
- Morath, S.U., Hung, R., Bennett, J.W., 2012. Fungal volatile organic compounds: A review with emphasis on their biotechnological potential. *Fungal Biol. Rev.* 26, 73–83. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2012.07.001>
- Moretti, A., Agnetti, F., Mancianti, F., Nardoni, S., Righi, C., Moretta, I., Morganti, G., Papini, M., 2013. Dermatophytosis in animals: Epidemiological, clinical and zoonotic aspects. *G. Ital. di Dermatologia e Venereol.* 148, 563–572.
- M  ller, A., Faubert, P., Hagen, M., zu Castell, W., Polle, A., Schnitzler, J.P., Rosenkranz, M., 2013. Volatile profiles of fungi - Chemotyping of species and ecological functions. *Fungal Genet. Biol.* 54, 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2013.02.005>
- Muraosa, Y., Toyotome, T., Yahiro, M., Kamei, K., 2019. Characterisation of novel-cell-wall LysM-domain proteins LdpA and LdpB from the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *Sci. Rep.* 9, 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40039-1>
- Naznin, H.A., Kiyohara, D., Kimura, M., Miyazawa, M., Shimizu, M., Hyakumachi, M., 2014. Systemic resistance induced by volatile organic compounds emitted by plant growth-promoting fungi in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* 9, e86882. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086882>
- Nenoff, P., Kr  ger, C., Ginter-Hanselmayer, G., Tietz, H.J., 2014a. Mycology-an update. Part 1: Dermatomycoses: Causative agents, epidemiology and pathogenesis. *JDDG - J. Ger. Soc. Dermatology* 12, 188–210. <https://doi.org/10.1111/ddg.12245>
- Nenoff, P., Kr  ger, C., Schaller, J., Ginter-Hanselmayer, G., Schulte-Beerb  hl, R., Tietz, H.J., 2014b. Mycology - An update Part 2: Dermatomycoses: Clinical picture and diagnostics. *JDDG - J. Ger. Soc. Dermatology* 12, 749–777. <https://doi.org/10.1111/ddg.12420>
- Nenoff, Uhlrass, Kruger, Erhard, Hippler, Seyfarth, Herrmann, Wetzig, T., Schroedl, W., Graser, Y., 2014. *Trichophyton* species of *Arthroderma benhamiae* - a new infectious agent in dermatology. *J Dtsch Dermatol Ges* 12, 571–581. <https://doi.org/10.1111/ddg.12390> [doi]
- Ng, A.S., Just, G., Blank, F., 1969. Metabolites of pathogenic fungi. VII. On the structure and stereochemistry of xanthomegnin, viioxanthin, and viopurpurin, pigments from *Trichophyton violaceum*. *Can. J. Chem.* 47, 1223–1227. <https://doi.org/10.1139/v69-197>
- Nicolaidis, N., Fu, H.C., Rice, G.R., 1968. The skin surface lipids of man compared with those of eighteen species of animals. *J. Invest. Dermatol.* 51, 83–89. <https://doi.org/10.1038/jid.1968.96>
- Nielsen, C.A.F., Folly, C., Hatsch, A., Molt, A., Schröder, H., O'Connor, S.E., Naesby, M., 2014. The important ergot alkaloid intermediate chanoclavine-I produced in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by the combined action of EasC and EasE from *Aspergillus japonicus*. *Microb. Cell Fact.* 13, 95. <https://doi.org/10.1186/s12934-014-0095-2>
- Nir-Paz, R., Elinav, H., Pierard, G.E., Walker, D., Maly, A., Shapiro, M., Barton, R.C., Polacheck, I., 2003. Deep Infection by *Trichophyton rubrum* in an Immunocompromised Patient. *J. Clin. Microbiol.* 41, 5298–5301. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.11.5298-5301.2003>
- NIST/EPA/NIH, 2014. NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library. Natl. Inst. Stand. Technol. Gaithersbg.

- Olivas, I., Royuela, M., Romero, B., Monteiro, M.C., Mínguez, J.M., Laborda, F., Lucas, J.R. De, 2008. Ability to grow on lipids accounts for the fully virulent phenotype in neutropenic mice of *Aspergillus fumigatus* null mutants in the key glyoxylate cycle enzymes. *Fungal Genet. Biol.* 45, 45–60. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2007.05.002>
- Olsen, I., Jantzen, E., 2001. Sphingolipids in bacteria and fungi. *Anaerobe* 7, 103–112. <https://doi.org/10.1006/anae.2001.0376>
- Onifade, A.A., Al-Sane, N.A., Al-Musallam, A.A., Al-Zarban, S., 1998. A review: potentials for biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources. *Bioresour. Technol.* 66, 1–11.
- Pavela, R., Morshedloo, M.R., Lupidi, G., Carolla, G., Barboni, L., Quassinti, L., Bramucci, M., Vitali, L.A., Petrelli, D., Kavallieratos, N.G., Boukouvala, M.C., Ntalli, N., Kontodimas, D.C., Maggi, F., Canale, A., Benelli, G., 2020. The volatile oils from the oleo-gum-resins of *Ferula assa-foetida* and *Ferula gummosa*: A comprehensive investigation of their insecticidal activity and ecotoxicological effects. *Food Chem. Toxicol.* 140, 111312. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111312>
- Peled, I.J., Netea, E., Lindenbaum, E., 1991. Prolonged skin graft preservation with keratinocyte culture medium. *Eur. J. Plast. Surg.* 14, 232–234.
- Petrucelli, M.F., Peronni, K., Sanches, P.R., Komoto, T.T., Matsuda, J.B., da Silva Junior, W.A., Belebani, R.O., Martinez-Rossi, N.M., Marins, M., Fachin, A.L., 2018. Dual RNA-Seq analysis of *Trichophyton rubrum* and HaCat keratinocyte co-culture highlights important genes for fungal-host interaction. *Genes (Basel)*. 9. <https://doi.org/10.3390/genes9070362>
- Pfaffl, M.W., Tichopad, A., Prgomet, C., Neuvians, T.P., 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper - Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol. Lett.* 26, 509–515. <https://doi.org/10.1023/B:BILE.0000019559.84305.47>
- Pihet, M., Vandeputte, P., Tronchin, G., Renier, G., Saulnier, P., Georgeault, S., Mallet, R., Chabasse, D., Symoens, F., Bouchara, J.P., 2009. Melanin is an essential component for the integrity of the cell wall of *Aspergillus fumigatus* conidia. *BMC Microbiol.* 9, 1–11. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-177>
- Pomeranz, A.J., Sabnis, S.S., McGrath, G.J., Esterly, N.B., 1999. Asymptomatic dermatophyte carriers in the households of children with tinea capitis. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* 153, 483–486. <https://doi.org/10.1001/archpedi.153.5.483>
- Poumay, Y., Dupont, F., Marcoux, S., Leclercq-Smekens, M., Hérin, M., Coquette, A., 2004. A simple reconstructed human epidermis: preparation of the culture model and utilization in in vitro studies. *Arch. Dermatol. Res.* 296, 203–211. <https://doi.org/10.1007/s00403-004-0507-y>
- Queitsch, C., Sangster, T.A., Lindquist, S., 2002. Hsp90 as a capacitor of phenotypic variation. *Nature* 417, 618–624. <https://doi.org/10.1038/nature749>
- Raguso, R.A., Roy, B.A., 1998. “Floral” scent production by *Puccinia* rust fungi that mimic flowers. *Mol. Ecol.* 7, 1127–1136. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1998.00426.x>
- Rashid, A., Scott, E., Richardson, M.D., 1995. Early events in the invasion of the human nail plate by *Trichophyton mentagrophytes*. *Br. J. Dermatol.* 133, 932–940. <https://doi.org/doi:10.1111/j.1365-2133.1995.tb06929.x>
- Ratiu, I.A., Bocos-Bintintan, V., Monedeiro, F., Milanowski, M., Ligor, T., Buszewski, B., 2019. An Optimistic Vision of Future: Diagnosis of Bacterial Infections by Sensing Their Associated Volatile Organic Compounds. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 1–12. <https://doi.org/10.1080/10408347.2019.1663147>

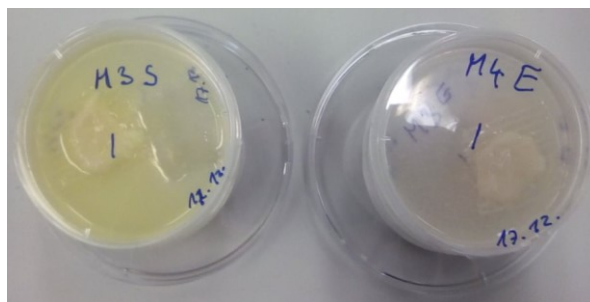
- Rees, C.A., Stefanuto, P.-H., Beattie, S.R., Bultman, K.M., Cramer, R.A., Hill, J.E., 2017. Sniffing out the hypoxia volatile metabolic signature of *Aspergillus fumigatus*. *J. Breath Res.* 11, 036003. <https://doi.org/10.1088/1752-7163/AA7B3E>
- Rinkel, J., Babczyk, A., Wang, T., Stadler, M., Dickschat, J.S., 2018. Volatiles from the hypoxylaceous fungi *Hypoxylon griseobrunneum* and *Hypoxylon macrocarpum*. *Beilstein J. Org. Chem.* 14, 2974–2990. <https://doi.org/10.3762/bjoc.14.277>
- Romano, C., Valenti, L., Barbara, R., 1997. Dermatophytes isolated from asymptomatic stray cats. *Mycoses* 40, 471–472. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.1997.tb00187.x>
- Rosenblum, E.B., Stajich, J.E., Maddox, N., Eisen, M.B., 2008. Global gene expression profiles for life stages of the deadly amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 17034–17039. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804173105>
- Rude, T.H., Toffaletti, D.L., Cox, G.M., Perfect, J.R., 2002. Relationship of the glyoxylate pathway to the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* 70, 5684–5694. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.10.5684-5694.2002>
- Rutherford, S.L., Lindquist, S., 1998. Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. *Nature* 396, 336–342. <https://doi.org/10.1038/24550>
- Sabou, M., Denis, J., Boulanger, N., Forouzanfar, F., Glatz, I., Lipsker, D., Poirier, P., Candolfi, E., Letscher-Bru, V., 2018. Molecular identification of *Trichophyton benhamiae* in Strasbourg, France: A 9-year retrospective study. *Med. Mycol.* 56, 723–734. <https://doi.org/10.1093/mmy/myx100>
- Sánchez-Fernández, R.E., Diaz, D., Duarte, G., Lappe-Oliveras, P., Sánchez, S., Macías-Rubalcava, M.L., 2016. Antifungal Volatile Organic Compounds from the Endophyte *Nodulisporium* sp. Strain GS4d2IIIa: a Qualitative Change in the Intraspecific and Interspecific Interactions with *Pythium aphanidermatum*. *Microb. Ecol.* 71, 347–364. <https://doi.org/10.1007/s00248-015-0679-3>
- Sánchez-Vallet, A., Saleem-Batcha, R., Kombrink, A., Hansen, G., Valkenburg, D.J., Thomma, B.P.H.J., Mesters, J.R., 2013. Fungal effector Ecp6 outcompetes host immune receptor for chitin binding through intrachain LysM dimerization. *Elife* 2013. <https://doi.org/10.7554/eLife.00790>
- Saunte, D.M., Hasselby, J.P., Brillowska-Dabrowska, A., Frimodt-Møller, N., Svejgaard, E.L., Linnemann, D., Nielsen, S.S., Hædersdal, M., Arendrup, M.C., 2008. Experimental guinea pig model of dermatophytosis: a simple and useful tool for the evaluation of new diagnostics and antifungals. *Med. Mycol.* 46, 303–313. <https://doi.org/10.1080/13693780801891732>
- Seebacher, C., Bouchara, J.-P., Mignon, B., 2008. Updates on the epidemiology of dermatophyte infections. *Mycopathologia* 166, 335–352.
- Semerád, J., Moeder, M., Filip, J., Pivokonský, M., Filipová, A., Cajthaml, T., 2019. Oxidative stress in microbes after exposure to iron nanoparticles: analysis of aldehydes as oxidative damage products of lipids and proteins. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 26, 33670–33682. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06370-w>
- Sharifzadeh, A., Shokri, H., 2016. In vitro evaluation of antifungal susceptibility and keratinase, elastase, lipase and DNase activities of different dermatophyte species isolated from clinical specimens in Iran. *Mycoses* 59, 710–719.
- Shiraki, Y., Ishibashi, Y., Hiruma, M., Nishikawa, A., Ikeda, S., 2006. Cytokine secretion profiles of human keratinocytes during *Trichophyton tonsurans* and *Arthroderma benhamiae* infections. *J. Med. Microbiol.* 55, 1175–1185.
- Shoham, S., Levitz, S.M., 2005. The immune response to fungal infections. *Br. J. Haematol.* 129, 569–582. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2005.05397.x>

- Skořepová, M., Hubka, V., Polášková, S., Stará, J., Čmoková, A., 2014. Naše první zkušenosti s infekcemi vyvolanými *Arthroderma benhamiae* (*Trichophyton* sp.). Čes-slov Derm 89, 192–198.
- Smijs, T.G.M., Bouwstra, J.A., Schuitmaker, H.J., Talebi, M., Pavel, S., 2007. A novel ex vivo skin model to study the susceptibility of the dermatophyte *Trichophyton rubrum* to photodynamic treatment in different growth phases. J. Antimicrob. Chemother. 59, 433–440. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl490>
- Soanes, D.M., Alam, I., Cornell, M., Wong, H.M., Hedeler, C., Paton, N.W., Rattray, M., Hubbard, S.J., Oliver, S.G., Talbot, N.J., 2008. Comparative genome analysis of filamentous fungi reveals gene family expansions associated with fungal pathogenesis. PLoS One 3, e2300. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002300>
- Sorensen, K.N., Clemons, K. V, Stevens, D.A., 1999. Murine models of blastomycosis, coccidioidomycosis, and histoplasmosis. Mycopathologia 146, 53–65.
- Stadler, M., Fournier, J., Læssøe, T., Chlebicki, A., Lechat, C., Flessa, F., Rambold, G., Peršoh, D., 2010. Chemotaxonomic and phylogenetic studies of *Thamnomyces* (*Xylariaceae*). Mycoscience 51, 189–207. <https://doi.org/10.1007/s10267-009-0028-9>
- Stadler, M., Wollweber, H., Mühlbauer, A., Asakawa, Y., Hashimoto, T., Rogers, J.D., Ju, Y.M., Wetzstein, H.G., Tichy, H.V., 2001. Molecular chemotaxonomy of *Daldinia* and other *Xylariaceae*. Mycol. Res. 105, 1191–1205. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(08\)61990-5](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(08)61990-5)
- Stadler, M., Yu-Ming, J.U., Rogers, J.D., 2004. Chemotaxonomy of *Entonaema*, *Rhopalostroma* and other *Xylariaceae*. Mycol. Res. 108, 239–256. <https://doi.org/10.1017/S0953756204009347>
- Staib, P., Zaugg, C., Mignon, B., Weber, J., Grumbt, M., Pradervand, S., Harshman, K., Monod, M., 2010. Differential gene expression in the pathogenic dermatophyte *Arthroderma benhamiae* in vitro versus during infection. Microbiology 156, 884–895. <https://doi.org/10.1099/mic.0.033464-0>
- Sterkel, A.K., Lorenzini, J.L., Fites, J.S., Vignesh, K.S., Sullivan, T.D., Wuthrich, M., Brandhorst, T., Hernandez-Santos, N., Deepe Jr, G.S., Klein, B.S., 2016. Fungal mimicry of a mammalian aminopeptidase disables innate immunity and promotes pathogenicity. Cell Host Microbe 19, 361–374.
- Suh, M.J., Fedorova, N.D., Cagas, S.E., Hastings, S., Fleischmann, R.D., Peterson, S.N., Perlin, D.S., Nierman, W.C., Pieper, R., Momany, M., 2012. Development stage-specific proteomic profiling uncovers small, lineage specific proteins most abundant in the *Aspergillus fumigatus* conidial proteome. Proteome Sci. 10, 1–13. <https://doi.org/10.1186/1477-5956-10-30>
- Summerbell, R.C., 2000. Form and function in the evolution of dermatophytes. Biol. dermatophytes other keratinophilic fungi. Rev. Iberoam. Micol. Bilbao, Spain 30–43.
- Symoens, F., Jousson, O., Packeu, A., Fratti, M., Staib, P., Mignon, B., Monod, M., 2013. The dermatophyte species *Arthroderma benhamiae*: Intraspecies variability and mating behaviour. J. Med. Microbiol. 62, 377–385. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.053223-0>
- Tabart, J., Baldo, A., Vermout, S., Nussgens, B., Lapiere, C., Losson, B., Mignon, B., 2007. Reconstructed interfollicular feline epidermis as a model for *Microsporum canis* dermatophytosis. J. Med. Microbiol. 56, 971–975. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.47115-0>
- Taborda, C.P., Da Silva, M.B., Nosanchuk, J.D., Travassos, L.R., 2008. Melanin as a virulence factor of *Paracoccidioides brasiliensis* and other dimorphic pathogenic fungi: a minireview. Mycopathologia 165, 331.
- Taylor, B.E., Wheeler, M.H., Szaniszló, P.J., 1987. Evidence for pentaketide melanin biosynthesis in dematiaceous human pathogenic fungi. Mycologia 79, 320–322.

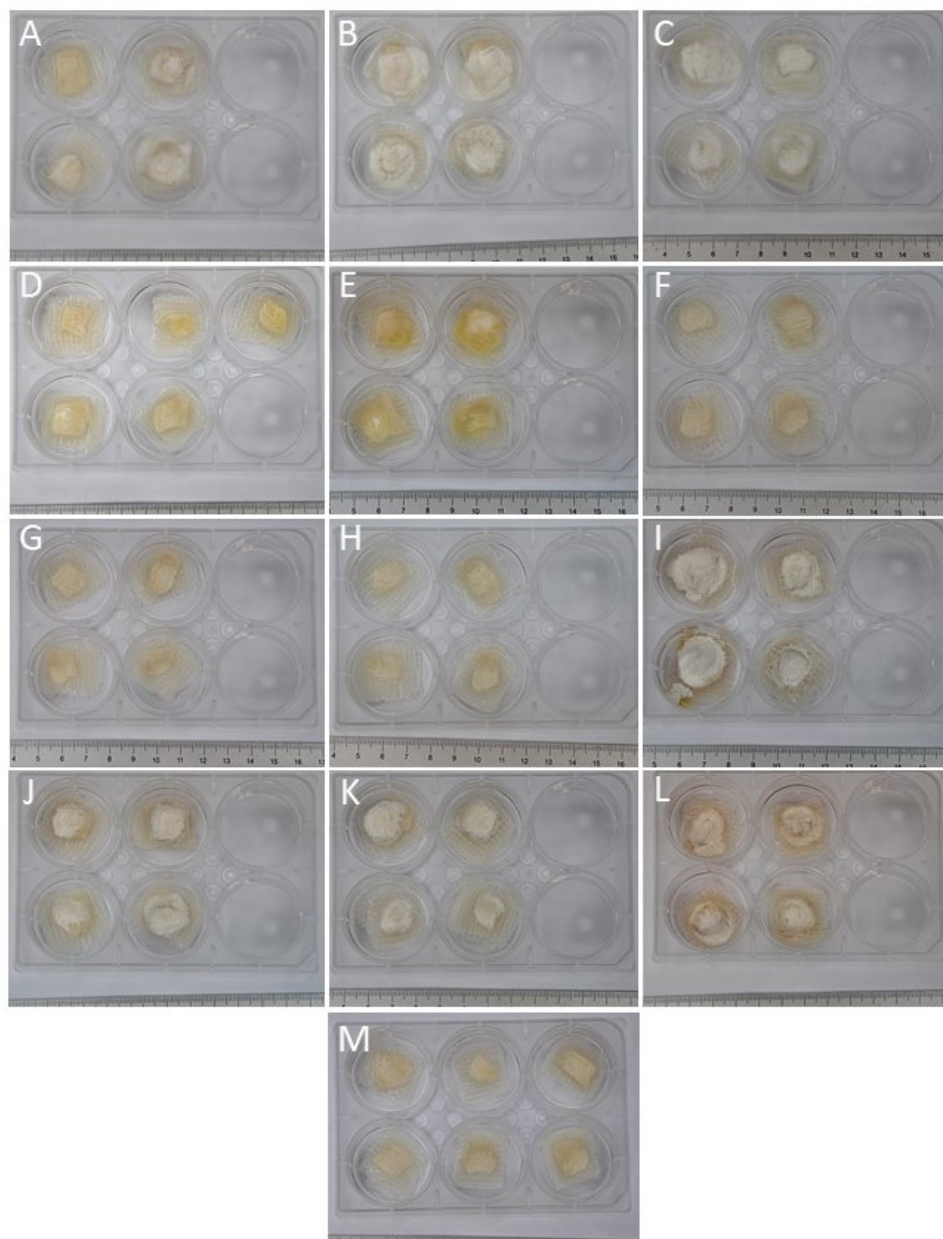
- Tejasvi, T., Sharma, V.K., Sethuraman, G., Singh, M.K., Xess, I., 2005. Invasive dermatophytosis with lymph node involvement in an immunocompetent patient. *Clin. Exp. Dermatol.* 30, 506–508.
- Thau, N., Monod, M., Crestani, B., Rolland, C., Tronchin, G., Latgé, J.P., Paris, S., 1994. Rodletless mutants of *Aspergillus fumigatus*. *Infect. Immun.* 62, 4380–4388.
- Thrane, U., Adler, A., Clasen, P.E., Galvano, F., Langseth, W., Lew, H., Logrieco, A., Nielsen, K.F., Ritieni, A., 2004. Diversity in metabolite production by *Fusarium langsethiae*, *Fusarium poae*, and *Fusarium sporotrichioides*. *Int. J. Food Microbiol.* 95, 257–266. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.12.005>
- Tran, V.D.T., De Coi, N., Feuermann, M., Schmid-Siegert, E., Bağcı, E.-T., Mignon, B., Waridel, P., Peter, C., Pradervand, S., Pagni, M., Monod, M., 2016. RNA Sequencing-Based Genome Reannotation of the Dermatophyte *Arthroderma benhamiae* and Characterization of Its Secretome and Whole Gene Expression Profile during Infection. *mSystems* 1, :00036-16. <https://doi.org/10.1128/msystems.00036-16>
- Volkert, M.R., 1988. Adaptive response of escherichia coli to alkylation damage. *Environ. Mol. Mutagen.* 11, 241–255. <https://doi.org/10.1002/em.2850110210>
- Wallwey, C., Heddergott, C., Xie, X., Brakhage, A.A., Li, S.M., 2012. Genome mining reveals the presence of a conserved gene cluster for the biosynthesis of ergot alkaloid precursors in the fungal family *Arthrodermataceae*. *Microbiol. (United Kingdom)* 158, 1634–1644. <https://doi.org/10.1099/mic.0.056796-0>
- Wang, X., Shi, F., Wösten, H.A.B., Hektor, H., Poolman, B., Robillard, G.T., 2005. The SC3 hydrophobin self-assembles into a membrane with distinct mass transfer properties. *Biophys. J.* 88, 3434–3443. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.057794>
- Wang, Z., Gerstein, M., Snyder, M., 2009. RNA-Seq: A revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.* 10, 57–63. <https://doi.org/10.1038/nrg2484>
- Wang, Z., Wang, J., Li, N., Li, J., Trail, F., Dunlap, J.C., Townsend, J.P., 2018. Light sensing by opsins and fungal ecology: NOP-1 modulates entry into sexual reproduction in response to environmental cues. *Mol. Ecol.* 27, 216–232. <https://doi.org/10.1111/mec.14425>
- Weitzman, I., Summerbell, R.C., 1995. The dermatophytes. *Clin. Microbiol. Rev.* 8, 240–259.
- Wirth, J.C., Beesley, T.E., Anand, S.R., 1965. The isolation of xanthomegnin from several strains of the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. *Phytochemistry* 4, 505–509.
- Woodfolk, J.A., 2005. Allergy and dermatophytes. *Clin. Microbiol. Rev.* 18, 30–43.
- Woodfolk, J.A., Wheatley, L.M., Piyasena, R. V., Benjamin, D.C., Platts-Mills, T.A.E., 1998. Trichophyton Antigens Associated with IgE Antibodies and Delayed Type Hypersensitivity Sequence Homology to Two Families of Serine Proteinases. *J. Biol. Chem.* 273, 29489–29496.
- Xie, F., Xiao, P., Chen, D., Xu, L., Zhang, B., 2012. miRDeepFinder: A miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant Mol. Biol.* 80, 75–84. <https://doi.org/10.1007/s11103-012-9885-2>
- Yin, W.B., Chooi, Y.H., Smith, A.R., Cacho, R.A., Hu, Y., White, T.C., Tang, Y., 2013. Discovery of cryptic polyketide metabolites from dermatophytes using heterologous expression in *Aspergillus nidulans*. *ACS Synth. Biol.* 2, 629–634. <https://doi.org/10.1021/sb400048b>
- Young, J.C., Hartl, F.U., 2000. Polypeptide release by Hsp90 involves ATP hydrolysis and is enhanced by the co-chaperone p23. *EMBO J.* 19, 5930–5940. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.21.5930>
- Youngchim, S., Pornsuwan, S., Nosanchuk, J.D., Dankai, W., Vanittanakom, N., 2011. Melanogenesis in dermatophyte species in vitro and during infection. *Microbiology* 157, 2348–2356. <https://doi.org/10.1099/mic.0.047928-0>

- Zaugg, C., Monod, M., Weber, J., Harshman, K., Pradervand, S., Thomas, J., Bueno, M., Giddey, K., Staib, P., 2009. Gene expression profiling in the human pathogenic dermatophyte *Trichophyton rubrum* during growth on proteins. *Eukaryot Cell* 8, 241–250.
- Zhan, P., Liu, W., 2017. The Changing Face of Dermatophytic Infections Worldwide. *Mycopathologia* 182, 77–86. <https://doi.org/10.1007/s11046-016-0082-8>
- Zhou, J., Feng, T., Ye, R., 2015. Differentiation of eight commercial mushrooms by electronic nose and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Sensors* 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/374013>
- Zinn, K., McAllister, L., Goodman, C.S., 1988. Sequence analysis and neuronal expression of fasciclin I in grasshopper and drosophila. *Cell* 53, 577–587. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90574-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90574-0)

Přílohy:



Příloha 1: Fotografie myších kožních explantátů ošetřených různými dezinfekčními látkami. Vpravo vzorky ošetřené chlornanem sodným, vlevo pouze ethanolem. U vzorků ošetřených chlornanem sodným lze pozorovat výrazné žluté zabarvení způsobené reakcí této látky s antibiotiky.



Příloha 2: Fotografie myších kožních explantátů 8 dní po inokulaci kmeny *T. benhamiae*. A = IHEM 4710; B = IHEM 3287; C = USA 3366; D = IHEM 25742; E = SK 1242/12; F = IHEM 25077; G = IHEM 20161; H = IHEM 25062; I = ME 192/12; J = IHEM 17701; K = VUT 97010; L = NUBS 13002; M = kontrola.

Příloha 3: Plný výstup z analýzy dat získaných sekvenací mRNA knihoven provedené v programu R v balíčku DESeq2. Jednotlivé geny byly srovnány s databází NCBI. Pokud to bylo možné, chybějící údaje byly doplněny srovnáním s databází UniProt. Porovnávány byly kmeny NUBS 13002 patřící do *T. japonicum* (vzorky 8 dpi na TSM + 8 dpi na MKE) versus IHEM 25743 patřící do *T. benhamiae* var. *luteum* (vzorky 8 dpi na TSM + 8 dpi na MKE). Záporné hodnoty získané Wald statistikou značí up-regulaci u *T. benhamiae* var. *luteum*, kladné up-regulaci u *T. japonicum*;

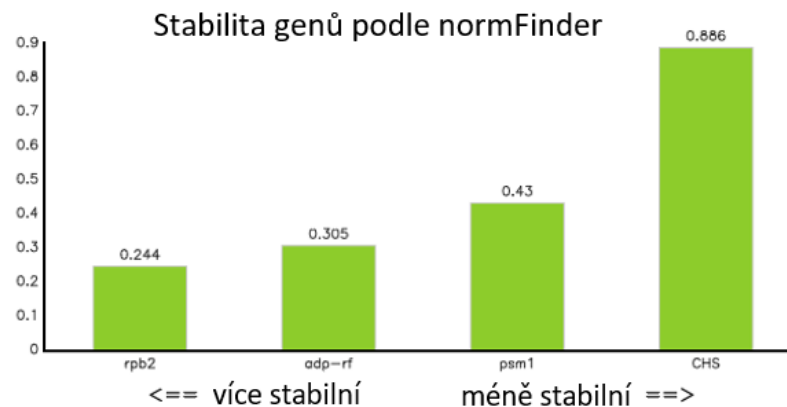
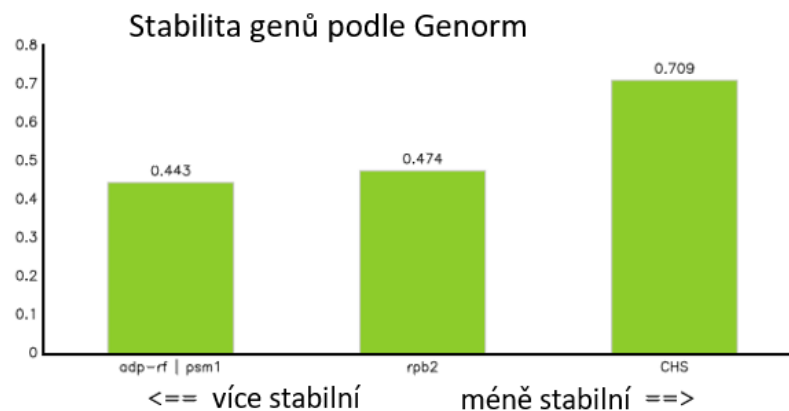
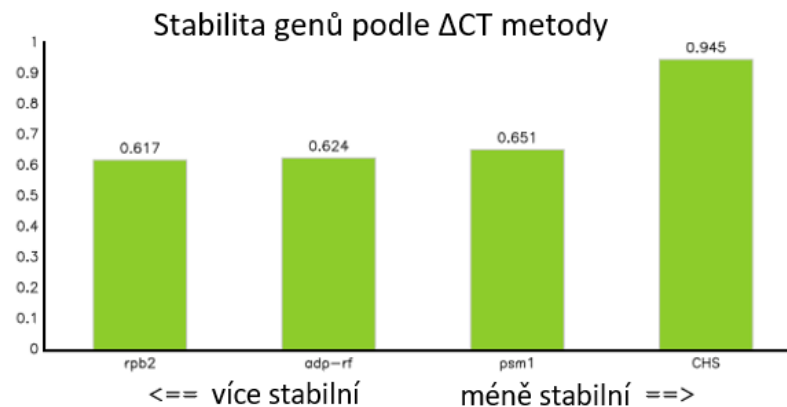
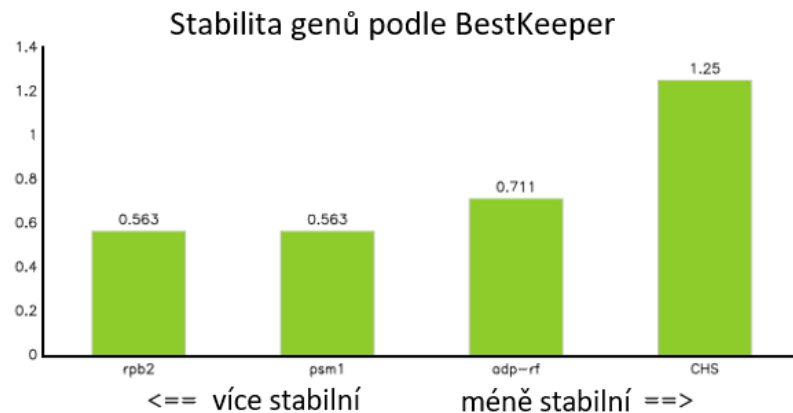
TSM = Tekuté Sabouraudovo médium, MKE = myší kožní explantáty, dpi = dny po inokulaci.

Gen	Průměr normalizovaných „countů“	Míra velikosti účinku (log2 fold change)	Standardní chyba průměru	Wald statistika	Wald test (p hodnota)	p hodnota upravená Benjamini- Hochberg korekcí	Anotace NCBI	Anotace UniProt
ARB_06975	713.60	-12.93	1.74	-7.43	1.08E-13	2.79E-10	hydrofobin, potenciální	-
ARB_05303	212.90	6,28	1,00	6,25	3,98E-10	5,13E-07	hypotetický protein	specifický pro dermatofyty
ARB_00847	115,74	-10,30	1,78	-5,78	7,57E-09	6,50E-06	hypotetický protein	-
ARB_07538	75,41	7,04	1,27	5,52	3,35E-08	2,16E-05	monooxygenáza vážící FAD, potenciální	-
ARB_03989	69,74	-9,57	1,89	-5,06	4,12E-07	0,00021239	hypotetický protein	-
ARB_04141	227,31	-8,32	1,66	-5,00	5,62E-07	0,000241575	hypotetický protein	-
ARB_07952	369,96	-7,88	1,61	-4,89	1,00E-06	0,000368249	hypotetický protein	-
ARB_04859	60,51	5,24	1,10	4,75	2,06E-06	0,000665092	oxalát dekarboxyláza, potenciální	-
ARB_01369	71,79	-9,62	2,05	-4,69	2,68E-06	0,000766431	hypotetický protein	specifický pro dermatofyty
ARB_05947	44,37	6,67	1,44	4,64	3,51E-06	0,000904687	hypotetický protein	protein s doménou typu PCMH vážící FAD
ARB_07993	14,14	7,46	1,68	4,46	8,39E-06	0,001966121	hypotetický protein	monooxygenáza s doménou vážící NADP

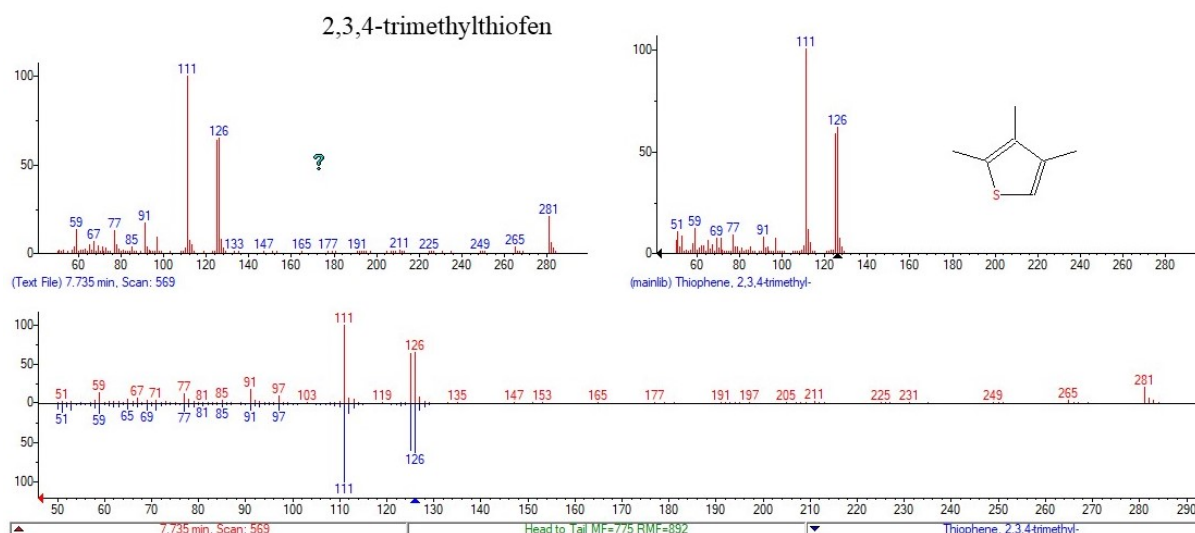
ARB_07994	30,34	6,81	1,54	4,42	9,92E-06	0,002131702	polyketid-syntáza konidiálního pigmentu PksP/Alb1	-
ARB_07534	83,79	6,68	1,52	4,40	1,09E-05	0,002164306	polyketid-syntáza podobná LovB, potenciální	-
ARB_04594	27,28	8,41	1,93	4,35	1,36E-05	0,002510168	hypotetický protein	protein se STAS doménou
ARB_02085	27,90	-8,24	1,91	-4,33	1,47E-05	0,002527892	hypotetický protein	protein s methyltransferázovou doménou
ARB_04644	55,59	-5,97	1,39	-4,28	1,80E-05	0,002898827	hypotetický protein	specifický pro dermatofyty
ARB_07518	39,21	-8,74	2,06	-4,24	2,19E-05	0,003139938	hypotetický protein	-
ARB_07536	57,45	8,54	2,01	4,25	2,13E-05	0,003139938	hypotetický protein	-
ARB_02932	57,23	6,90	1,64	4,20	2,65E-05	0,003589042	RTA1 domain protein, potenciální	-
ARB_03861	19,23	5,13	1,25	4,10	4,18E-05	0,004509093	glutathione S transferáza podobná Ure2, potenciální	-
ARB_04430	19,94	-7,77	1,89	-4,10	4,07E-05	0,004509093	hypotetický protein	-
ARB_05141	20,94	-7,83	1,91	-4,11	3,93E-05	0,004509093	hypotetický protein	-
ARB_05274	113,46	4,88	1,18	4,14	3,50E-05	0,004509093	konzervovaný hypotetický protein	-
ARB_06429	41,80	-8,83	2,17	-4,08	4,55E-05	0,004509093	O-methyltransferáza	-
ARB_07951	67,69	-8,16	1,99	-4,10	4,20E-05	0,004509093	hypotetický protein	protein účastníci se produkce mykotoxinů
ARB_07989	10,22	6,99	1,71	4,08	4,47E-05	0,004509093	O-methyltransferáza, potenciální	-
ARB_05392	49,73	-7,71	1,90	-4,07	4,75E-05	0,004530836	hypotetický protein	potenciální chitináza
ARB_03721	52,26	5,95	1,48	4,03	5,48E-05	0,004873781	hypotetický protein	protein s hydrolázovou doménou
ARB_06173	20,95	4,71	1,17	4,04	5,41E-05	0,004873781	alkohol dehydrogenáza obsahující zinek, potenciální	-
ARB_07276	22,91	4,43	1,11	4,00	6,33E-05	0,005440342	hypotetický protein	protein s thioredoxinovou aktivitou

ARB_07992	19,02	6,88	1,76	3,92	8,93E-05	0,007428978	protein s dehydrogenázou/reduktázou krátkých řetězců	-
ARB_07535	35,82	7,17	1,85	3,90	0,000103208	0,008314656	hypotetický protein	monooxygenáza
ARB_01258	33,11	-3,98	1,03	-3,87	0,000107129	0,008369058	hypotetický protein	-
ARB_00424	95,28	3,36	0,88	3,86	0,000114051	0,008647784	hypotetický protein	specifický pro dermatofyty
ARB_01724	52,05	-5,27	1,39	-3,80	0,000142683	0,010217699	ko-chaperon Sba1, potenciální	-
ARB_05812	16,42	4,78	1,26	3,80	0,000142163	0,010217699	hypotetický protein	protein s doménou hydroxylázy mastných kyselin
ARB_01444	30,72	-7,02	1,88	-3,72	0,000196567	0,013695931	hypotetický protein	potenciální endo-1,3(4)-beta-glukanáza
ARB_01072	6,74	6,40	1,73	3,71	0,000206945	0,013847169	karboxyesteráza, potenciální	-
ARB_07246	24,20	-8,03	2,17	-3,71	0,00020948	0,013847169	hypotetický protein	specifický pro dermatofyty
ARB_07517	9,56	-6,72	1,85	-3,64	0,000270622	0,017441562	hypotetický protein	protein s abhydrolázovou doménou
ARB_03514	13,21	-7,19	1,98	-3,63	0,00027885	0,017533574	Chitináza III. třídy ChiA2	-
ARB_05391	38,07	3,70	1,03	3,61	0,000307758	0,018890488	Peptidový transportér z rodiny PTR, potenciální	-
ARB_01940	23,51	4,03	1,12	3,60	0,00031624	0,018959696	homogentisát 1,2-dioxygenáza, potenciální	-
ARB_02208	29,80	3,51	0,98	3,57	0,000357237	0,020930831	hypotetický protein	oxalát dekarboxyláza
ARB_04769	22,96	7,16	2,04	3,51	0,000441864	0,025313913	hypotetický protein	potenciální metaloproteáza
ARB_04955	7,59	-6,38	1,84	-3,47	0,000524761	0,028783718	hypotetický protein	-
ARB_07991	7,25	6,49	1,87	3,47	0,000522028	0,028783718	protein s fasciclinovou doménou	-
ARB_05140	7,37	-6,31	1,82	-3,46	0,000536379	0,028808022	hypotetický protein	protein s proteinkinázovou doménou
ARB_04467	26,51	-3,63	1,06	-3,44	0,000582195	0,029876008	glukanáza, potenciální	-
ARB_06241	17,47	-6,20	1,81	-3,44	0,000590757	0,029876008	opsin, potenciální	-

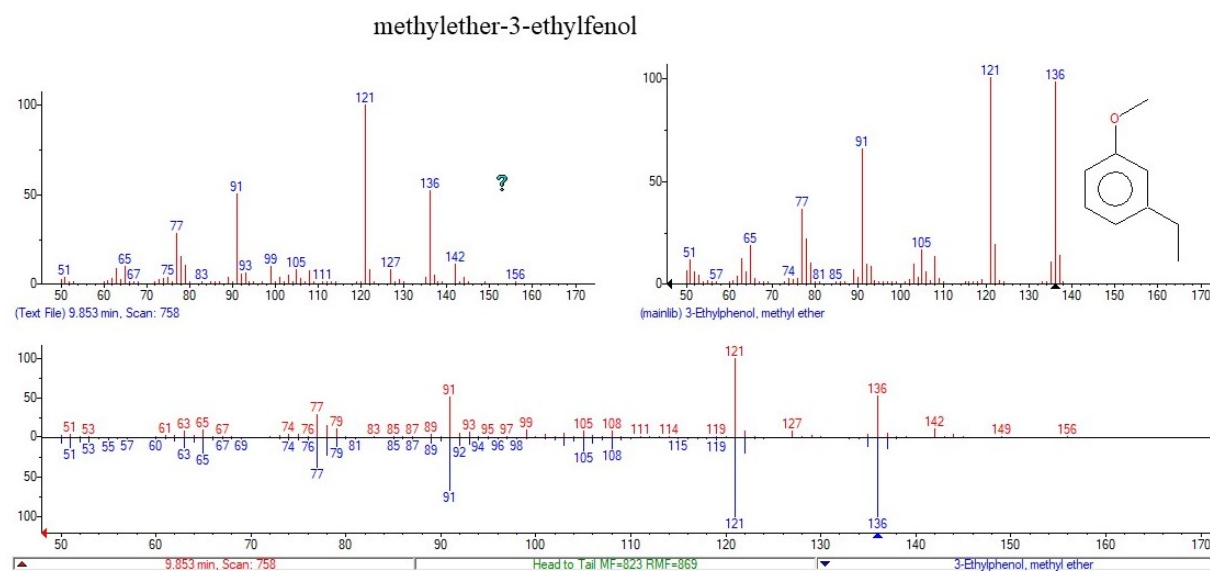
ARB_07966	24,05	3,54	1,03	3,44	0,00059103	0,029876008	hypotetický protein	potenciální polyketid-syntáza
ARB_01579	6,86	-6,23	1,82	-3,42	0,000614926	0,029923618	hypotetický protein	-
ARB_04645	25,28	-6,58	1,92	-3,42	0,000615187	0,029923618	hypotetický protein	kataláza EasC
ARB_01248	22,65	4,06	1,21	3,35	0,000800954	0,0370185	alkohol dehydrogenáza obsahující zinek, potenciální	-
ARB_03395	18,23	-4,27	1,27	-3,35	0,000804126	0,0370185	protein Aos23, potenciální	-
ARB_07818	23,98	-3,27	0,97	-3,36	0,000792001	0,0370185	monooxygenáza cytochromu P450, potenciální	-
ARB_00651	7,07	-6,23	1,87	-3,32	0,000884572	0,0400075	hypotetický protein	protein s HNHc doménou
ARB_01027	48,13	3,07	0,93	3,31	0,000930436	0,040655311	hypotetický protein	protein s MFS doménou
ARB_02715	24,14	4,46	1,35	3,31	0,000926143	0,040655311	hypotetický protein	potenciální dipeptidyl peptidáza
ARB_00746	7,78	5,62	1,71	3,28	0,001034781	0,043732206	hypotetický protein	protein s MFS doménou
ARB_03863	7,69	-6,41	1,95	-3,28	0,001034215	0,043732206	hypotetický protein	-
ARB_01913	6,75	-6,22	1,90	-3,27	0,001077587	0,044806766	hypotetický protein	-
ARB_03617	107,56	-2,60	0,80	-3,24	0,001196748	0,048971704	hypotetický protein	-
ARB_04058	14,79	-4,17	1,29	-3,23	0,001227318	0,049318659	DNA opravný a transkripční faktor Ada, potenciální	-
ARB_07483	624,68	-2,95	0,91	-3,23	0,001243488	0,049318659	protein teplotního šoku Awh11, potenciální	-



Příloha 4: Výsledky stability referenčních genů *rpb2*, *adp-rf*, *psm1* a *CHS* studované metodou ΔCt , a nástroji BestKeeper, normFinder a Genorm. Všechny testy byly provedeny automaticky v online nástroji RefFinder.

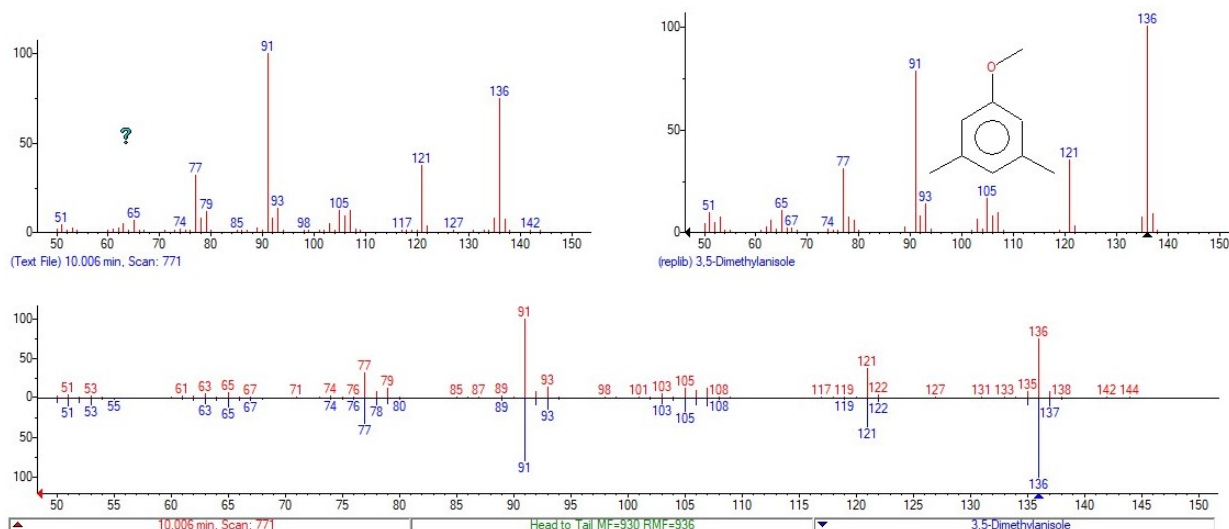


Příloha 5: Výsledek srovnání hmotnostního spektra naměřené látky specifické pro populaci *T. benhamiae* var. *luteum* s hmotnostním spektrem identifikované látky 2,3,4-trimethylthiophen knihovnou NIST 2014 provedeného v programu MS Data Review.



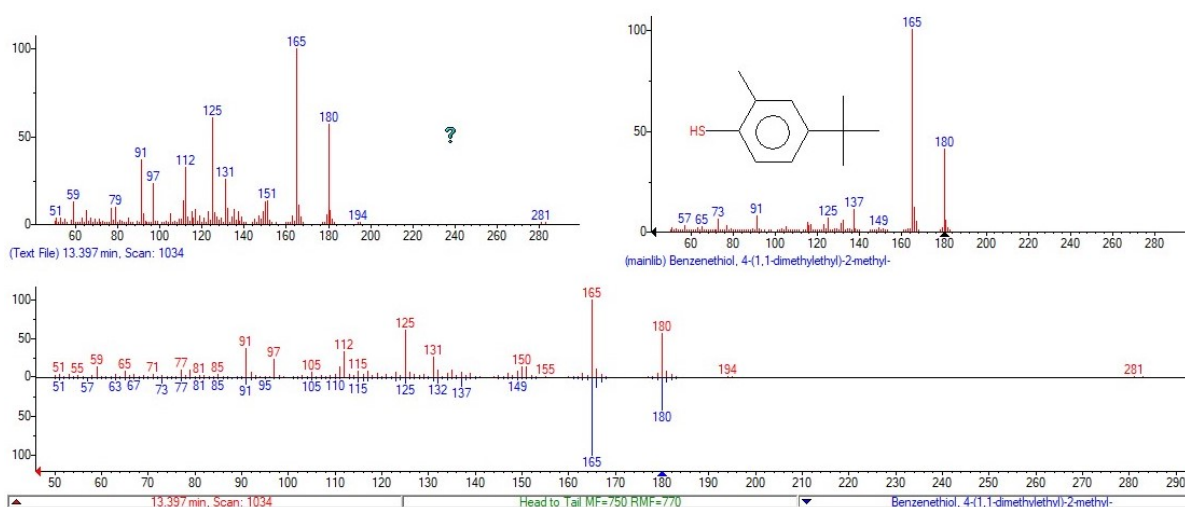
Příloha 6: Výsledek srovnání hmotnostního spektra naměřené látky specifické pro populaci *T. benhamiae* var. *luteum* s hmotnostním spektrem identifikované látky methylether-3-ethylfenol knihovnou NIST 2014 provedeného v programu MS Data Review.

3,5-dimethylanisol



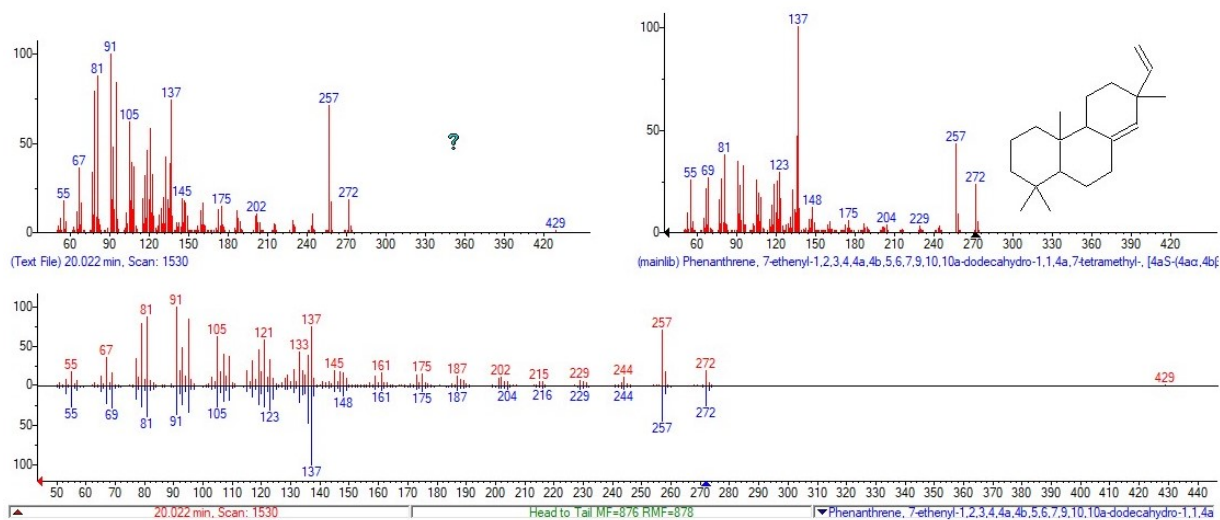
Příloha 7: Výsledek srovnání hmotnostního spektra naměřené látky specifické pro populaci *T. benhamiae* var. *luteum* s hmotnostním spektrem identifikované látky 3,5-dimethylanisol knihovnou NIST 2014 provedeného v programu MS Data Review.

4-(1,1-dimethylethyl)-2-methyl-thiofenol



Příloha 8: Výsledek srovnání hmotnostního spektra naměřené látky specifické pro populaci *T. benhamiae* var. *luteum* s hmotnostním spektrem identifikované látky 4-(1,1-dimethylethyl)-2-methyl-thiofenol knihovnou NIST 2014 provedeného v programu MS Data Review.

blíže neurčená struktura



Příloha 9: Výsledek srovnání hmotnostního spektra naměřené látky specifické pro populaci *T. benhamiae* var. *luteum* s hmotnostním spektrem přesněji neidentifikované látky knihovnou NIST 2014 provedeného v programu MS Data Review.